

09/936885 PCT/JP00/01646  
17.03.00

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 05 MAY 2000

WIPO

PCT

JP00/01646

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年10月28日



出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第306623号

出 願 人

Applicant (s):

黒川 清  
宮田 敏男  
扶桑薬品工業株式会社

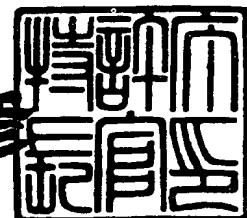
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 4月21日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特2000-3027988

【書類名】 特許願

【整理番号】 F2-101DP1

【提出日】 平成11年10月28日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/53

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県伊勢原市東成瀬 4 - 2 - 3 - 1 0 1

    【氏名】 宮田 敏男

【特許出願人】

    【識別番号】 597142387

    【氏名又は名称】 黒川 清

【特許出願人】

    【識別番号】 597142376

    【氏名又は名称】 宮田 敏男

【特許出願人】

    【識別番号】 000238201

    【氏名又は名称】 扶桑薬品工業株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100102978

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

    【識別番号】 100108774

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 橋本 一憲

【先の出願に基づく優先権主張】

    【出願番号】 平成11年特許願第 75305号

    【出願日】 平成11年 3月19日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】

メグシタンパク質の検出方法およびその用途

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 生体試料中のメグシタンパク質を測定することからなる、腎機能評価方法。

【請求項 2】 生体試料中のメグシタンパク質を測定し、正常な試料のメグシタンパク質の測定値と比較することからなる、請求項 1 に記載の腎機能評価方法。

【請求項 3】 生体試料が尿である請求項 1 に記載の腎機能評価方法。

【請求項 4】 生体試料中のメグシタンパク質を、抗メグシタンパク質抗体を用いた抗原抗体反応によって測定することを特徴とする請求項 1 に記載の腎機能評価方法。

【請求項 5】 抗メグシタンパク質抗体がモノクローナル抗体である、請求項 4 に記載の腎機能評価方法。

【請求項 6】 抗メグシタンパク質抗体を含む腎機能診断用試薬。

【請求項 7】 抗メグシタンパク質抗体がモノクローナル抗体である、請求項 6 に記載の腎機能診断用試薬。

【請求項 8】 固体顆粒の表面に、抗メグシタンパク質抗体を結合した、生体試料中に含まれるメグシタンパク質検出用顆粒。

【請求項 9】 固体顆粒が磁性を有するものである、請求項 8 に記載のメグシタンパク質検出用顆粒。

【請求項 10】 固体顆粒の比重が 1 以上である、請求項 8 に記載のメグシタンパク質検出用顆粒。

【請求項 11】 抗メグシタンパク質抗体がモノクローナル抗体である、請求項 8 に記載のメグシタンパク質検出用顆粒。

【請求項 12】 下記工程を含むことを特徴とする、生体試料中に含まれるメグシタンパク質の検出方法。

i) 固体顆粒の表面に第 1 の抗メグシタンパク質抗体を結合したメグシタンバ

ク質検出用顆粒を生体試料と接触させる工程

ii) 生体試料を接触させた前記メグシンタンパク質検出用顆粒に、標識分子を結合した第 2 の抗メグシンタンパク質抗体を接触させる工程、および

iii) 前記第 2 の抗メグシンタンパク質抗体を介してメグシンタンパク質と結合している前記標識分子を検出する工程

【請求項 1 3】 第 1 の抗メグシンタンパク質抗体、および第 2 の抗メグシンタンパク質抗体がモノクローナル抗体である請求項 1 2 に記載の検出方法。

【請求項 1 4】 第 1 の抗メグシンタンパク質抗体および第 2 の抗メグシンタンパク質抗体が異なる認識部位を有する抗メグシンタンパク質抗体である請求項 1 3 に記載の検出方法。

【請求項 1 5】 生体試料が尿である請求項 1 2 に記載の検出方法。

【請求項 1 6】 生体試料が血液である請求項 1 2 に記載の検出方法。

【請求項 1 7】 以下の要素を含むメグシンタンパク質検出用キット。

- a) 抗メグシンタンパク質抗体を結合するための磁性固体顆粒、
- b) 前記磁性固体粒子に予め固定されるか、または間接的に固定することができる抗メグシンタンパク質抗体、および
- c) 磁石

【請求項 1 8】 さらに標識分子を結合した抗メグシンタンパク質抗体を含む、請求項 1 7 に記載のメグシンタンパク質検出用キット。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は尿や血液などの生体試料中に含まれるメグシンタンパク質を測定することからなる腎機能評価方法に関する。さらに本発明は、抗メグシンタンパク質抗体を含む腎機能診断用試薬に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

腎臓の血液濾過作用や解毒作用が全く機能しない末期腎不全においては、腎移植が唯一の治療手段であるが、我が国においては、移植腎の供給体制が十分に整

備されているとは言い難い。また、移植療法自体に対する社会的認知も進んでいないことなどから、腎代用療法としては透析療法に頼らざるを得ないのが現状である。

現在、日本の透析患者は推定約 1 7 万人を数える。一人当たりの平均的な治療費は年間約 6 0 0 万円を必要とし、医療保険制度を圧迫する大きな原因の一つとされている。また、毎週 2 ～ 3 日、1 日 4 ～ 6 時間を透析治療のために拘束されることから、患者本人の社会活動も大きく妨げられることになる。

腎不全は、腎疾患患者が最終的に至る病態である。その原因や経歴は一様ではなく、薬物中毒、感染症、悪性腫瘍、糖尿病、全身性エリテマトーデス（SLE）などの本来腎臓以外の病変により、腎障害が発症し、腎不全に至る場合も数多くみられる。

腎障害においては、末期即ち腎不全近くになるまで顕著な自覚症状が現れないことから、その発症が見過ごされ易く、発症した時点では既に腎臓は回復不可能なダメージを受けている場合が多い。従って、自覚症状の発現をみる前に、できる限り初期の段階で腎障害を発見することが、腎不全への移行を防ぐために、また、透析治療による保険財政圧迫を避けるためにも大切である。

### 【 0 0 0 3 】

従来、腎障害を診断する手がかりとして、いわゆる検尿による尿タンパクや尿沈渣の検査が広く行われている。しかし、尿タンパクは健常人でも過激な運動、精神的ストレス、多量の肉食、月経前などで一過性に増加する。また、若年者に多くみられる（健常人の 0.5 % 程度）起立性タンパク尿など、腎疾患に由来しない尿タンパクもある。さらに尿路疾患、膀胱疾患、女性性器疾患などでも尿タンパクが認められる。従って、尿タンパクの検査のみで腎障害を確定診断することは困難である。

尿沈渣は、尿を遠心分離し、その沈渣を顕微鏡で観察するものであるが、赤血球沈渣は健常人でもみられ、腎障害以外の尿路系関連臓器に由来する場合もあるので、これもまた腎障害の確定診断には不十分である。

また、糖尿病性腎症の診断の指標として尿中に漏洩したアルブミンを定量し、健常人の正常値と比較して早期の糖尿病性腎症を特定する方法が知られている。

しかし、尿中のアルブミン量は健常人においても変動することから、糖尿病性腎症の正確な病態を把握することはできない。

さらに、尿成分の血中停滞を検査する目的で血清クレアチニン（Cr）、血中尿素窒素（BUN）の測定なども行われるが、これらの検査も食事の影響を受けやすい。このように、尿タンパクや血清Cr、BUNの検査において異常値が顕れても、それが必ずしも腎障害に由来するものとは限らず、健常人や他の疾患でもしばしば異常値が発現する。

#### 【0004】

他に、尿中 $\beta_2$ -ミクログロブリン、N-アセチルグルコサミニダーゼ（NAG）、IgG、トランスフェリン、あるいはインターロイキン-6など様々な物質の測定による腎障害の診断が試みられているが、腎障害の重症度と一致しない場合も多く、いずれも有効でない。

また、これら血液成分を尿中で測定する方法については、腎全体の障害または免疫反応の関与を推測することは可能であるが、腎組織内の障害部位を特定することは困難である。そして、上記に列記した手段以外には、腎障害の診断および重症度の判定に十分な感度および特異性を有する検査方法はまだ知られていない。現在のところ、腎障害の診断や重症度の最終的判定には、腎生検による組織学的診断が不可欠とされている。

#### 【0005】

しかしながら、腎生検は侵襲的検査であり、出血、感染などの合併症の危険性が常に伴う。また、検査を実施するためには、専門医と設備の整った施設に入院しなければならない、患者への肉体的、社会的負担は無視できない。

以上のように、検尿による検査は簡便で、且つ、多量の検体を処理できる優れた検査方法ではあるが、腎障害の確定診断という観点からは満足できるものではない。一方、腎生検は、腎障害の診断、重症度の判定は確実であるものの、その利用は極く限られたものとならざるを得ない。このような背景から検尿の簡便さと、腎生検の正確さを兼ね備えた腎障害の診断方法が望まれていた。

#### 【0006】

さて、腎に限らず特定の組織に特異的に発現しているタンパク質は、しばしば

その臓器の機能障害の指標として用いられる。たとえば、LDHや $\gamma$ GTPといった酵素タンパク質は、肝機能マーカーとして広く利用されている。しかし腎においては、その機能の指標となるような腎に特異的なタンパク質の存在は知られていない。

ところで、本発明者は、大規模DNA配列決定およびデータベース解析により、メサンギウム細胞で特に強く発現する遺伝子として、メグシンと命名した遺伝子を単離している。そして、メグシンの全長cDNAクローンがコードする380個のアミノ酸からなる新規タンパク質であるメグシンタンパク質を取得することに成功した。更に、Swiss Protデータベースを用いてFASTAプログラムによるアミノ酸ホモロジー検索を行ったところ、ヒトメグシンタンパク質が、SERPIN（セリンプロテアーゼインヒビター）スーパーファミリー（R.Carrell et al., Trends Biochem.Sci., 第10巻, 20頁, 1985年; R.Carrell et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 第52巻, 527頁, 1987年; E.K.O.Kruithof et al., Blood, 第86巻, 4007頁, 1995年; J.Potempa et al., J.Biol.Chem., 第269巻, 15957頁, 1994年; E.Remold-O'Donnell, FEBS Let., 第315巻, 105頁, 1993年）に属するタンパク質であることを見出した（T.Miyata et al., J.Clin.Invest., 第120巻, 828-836頁, 1998年）。そしてこの知見を特許出願した（PCT出願 PCT/JP98/04269）。

ヒトメグシンタンパク質は、ヒト繊維芽細胞、平滑筋細胞、内皮細胞およびケラチノサイトでは発現が弱く、メサンギウム細胞において特に強く発現している。また、IgA腎症患者と健常人とで腎臓組織中のメグシンタンパク質の発現量を比較したところ、IgA腎症腎症患者においてメグシンタンパク質の発現量が有意に高いことを見出した。従って、尿中あるいは血中に存在するメグシンタンパク質を測定することは、たとえばIgA腎症などのメサンギウム細胞増殖性腎症のマーカーとして有用であると考えられる。このように、メグシンタンパク質遺伝子の発現は腎疾患の発症およびその亢進に深く関与している可能性が窺われるが、腎疾患の病態の進行との相関関係については明らかにされていなかった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】



本発明は、上記のような課題を解決し、腎疾患の診断や重症度の判定を可能とする方法と、そのための試薬、あるいは試薬キットの提供を課題としている。

【0008】

【課題を解決するための手段】

まず本発明者は、腎障害の確定診断および重症度を判定するためには、病態と密接に関連した特異的なタンパク質を測定する必要があると考えた。そこで、糸球体に存在するメサンギウム細胞 (mesangial cell) に注目した。メサンギウム (mesangium) は、腎糸球体の毛細管係蹄の小葉中心部に位置し、各小葉を結びつける芯となる組織である。メサンギウムは糸球体基底膜に覆われており、毛細管腔とは内皮細胞によって隔てられている細胞 (メサンギウム細胞) と3層からなる糸球体基底膜の中の内透明層と連続している無形物質 (メサンギウム基質: mesangial matrix) から構成されている。

【0009】

メサンギウム細胞は、腎糸球体の構造および機能の維持に中心的な役割を果たしていることが知られている。またその増殖は、糸球体腎炎や糸球体硬化症などの糸球体疾患の発症における主要な要因であると考えられている。そして、メサンギウム細胞は、各種腎炎において障害の標的となっている。例えば、メサンギウム細胞の増殖や細胞外メサンギウム基質の蓄積は、末期腎不全の2大原因である慢性糸球体腎炎および糖尿病性腎症のような種々の糸球体障害を有する患者に糸球体硬化症をもたらす最初の過程とされている (D.Schlondorff, *Kidney Int.*, 第49巻, 1583-1585頁, 1996年; R.B.Sterzel et al., *Glomerular mesangial cells. Immunologic Renal Diseases*, 595-626頁, 1997年)。従って、メサンギウム細胞で特異的に発現している遺伝子を見だし、その発現の調節機構や腎疾患における病態との関連性を明らかにすることは、メサンギウム細胞の生物学的性質の解明、メサンギウム細胞に関連する疾患の原因の究明、更にはメサンギウム細胞に関連する疾病の治療、診断等に有効であると考えられる。

また、メサンギウム細胞の増殖の激しいIgA腎症に対しては、近年、ステロイド剤の有効性が報告されている (J.V.Donadio et al., *J.Am.Soc.Nephrol.*, 第8巻, 1324-1332, 1997)。しかしステロイド剤は、一方で重篤な副作用の発現も見ら

れることから、ステロイド剤が無効の I g A 腎症に漫然とステロイド剤を投与することは避けなければならない。したがって、ステロイド療法においては、メサングウム細胞の増殖の程度等の組織重傷度とのマッチングが必須であり、そのためにもメサングウム細胞の増殖の程度を簡便に評価できる腎機能検査法が望まれていた。

本発明者は、腎疾患の発症およびその亢進に関連してメグシタンパク質遺伝子の発現が増加し、それに伴ってメグシタンパク質の産生が増大すれば、尿中あるいは血中へメグシタンパク質が漏出し、しかもその漏出量は病態の進行に伴って増加するのではないかと考えた。そしてこのメカニズムを確かめるために、様々な生体試料中のメグシタンパク質濃度、あるいはその量の測定と比較を試み、その測定値に基づいてメグシタンパク質が関与した腎疾患の状態を評価し得ることを見出し本発明に到達した。すなわち本発明は、以下の腎機能評価方法と、そのための試薬、あるいは試薬キットに関する。

〔1〕 生体試料中のメグシタンパク質を測定することからなる、腎機能評価方法。

〔2〕 生体試料中のメグシタンパク質を測定し、正常な試料のメグシタンパク質の測定値と比較することからなる、〔1〕に記載の腎機能評価方法。

〔3〕 生体試料が尿である〔1〕に記載の腎機能評価方法。

〔4〕 生体試料中のメグシタンパク質を、抗メグシタンパク質抗体を用いた抗原抗体反応によって測定することを特徴とする〔1〕に記載の腎機能評価方法。

〔5〕 抗メグシタンパク質抗体がモノクローナル抗体である、〔4〕に記載の腎機能評価方法。

〔6〕 抗メグシタンパク質抗体を含む腎機能診断用試薬。

〔7〕 抗メグシタンパク質抗体がモノクローナル抗体である、〔6〕に記載の腎機能診断用試薬。

〔8〕 固体顆粒の表面に、抗メグシタンパク質抗体を結合した、生体試料中に含まれるメグシタンパク質検出用顆粒。

〔9〕 固体顆粒が磁性を有するものである、〔8〕に記載のメグシタンパク質

検出用顆粒。

〔10〕固体顆粒の比重が1以上である、〔8〕に記載のメグシタンパク質検出用顆粒。

〔11〕抗メグシタンパク質抗体がモノクローナル抗体である、〔8〕に記載のメグシタンパク質検出用顆粒。

〔12〕下記工程を含むことを特徴とする、生体試料中に含まれるメグシタンパク質の検出方法。

i) 固体顆粒の表面に第1の抗メグシタンパク質抗体を結合したメグシタンパク質検出用顆粒を生体試料と接触させる工程

ii) 生体試料を接触させた前記メグシタンパク質検出用顆粒に、標識分子を結合した第2の抗メグシタンパク質抗体を接触させる工程、および

iii) 前記第2の抗メグシタンパク質抗体を介してメグシタンパク質と結合している前記標識分子を検出する工程

〔13〕第1の抗メグシタンパク質抗体、および第2の抗メグシタンパク質抗体がモノクローナル抗体である〔12〕に記載の検出方法。

〔14〕第1の抗メグシタンパク質抗体および第2の抗メグシタンパク質抗体が異なる認識部位を有する抗メグシタンパク質抗体である〔13〕に記載の検出方法。

〔15〕生体試料が尿である〔12〕に記載の検出方法。

〔16〕生体試料が血液である〔12〕に記載の検出方法。

〔17〕以下の要素を含むメグシタンパク質検出用キット。

a) 抗メグシタンパク質抗体を結合するための磁性固体顆粒、

b) 前記磁性個体粒子に予め固定されるか、または間接的に固定することができる抗メグシタンパク質抗体、および

c) 磁石

〔18〕さらに標識分子を結合した抗メグシタンパク質抗体を含む、〔17〕に記載のメグシタンパク質検出用キット。

【0010】

【発明の実施の形態】

メグシントタンパク質は、先に述べたようにヒト腎メサンギウム細胞で高度に発現している遺伝子によってコードされるタンパク質として単離された。本発明におけるメグシントタンパク質には、配列番号：2に示すアミノ酸配列を持つタンパク質（ヒト・メグシントタンパク質）のみならず、その機能的に同等なタンパク質をも含まれる。機能的に同等なタンパク質としては、たとえばヒト以外の種におけるメグシントタンパク質のホモログを示すことができる。あるいは、生体試料中に見出すことができ腎機能の指標とすることが可能であれば、それらの前駆体や断片のほか、メグシントタンパク質とプロテアーゼの複合体を指標とすることも可能である。ヒト以外の種におけるメグシントタンパク質のホモログは、その種における腎機能の評価の指標とすることができる。したがって、腎機能障害のモデルにおける病態の把握に有用である。

#### 【0011】

ヒト以外の種に由来するメグシントタンパク質のホモログは、たとえば次のようにして得ることができる。配列番号：1に示すヒトのメグシントタンパク質をコードするcDNAの塩基配列を元に、ORFの前後にディジェネレーティブプライマーを設定し、これを利用したPCRによってホモログのcDNAを増幅する。増幅されたcDNAが完全長でない場合には、5' RACE法などによって更に上流の塩基配列を明らかにすることができる。たとえばラットにおいては、培養メサンギウム細胞から抽出したmRNAを鋳型としてRT-PCRを行う。このときに用いるディジェネレーティブプライマーとしては、たとえば次の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを用いることができる。このPCRによって得られるクローンを配列決定すれば、ラットにおけるメグシントタンパク質のホモログの構造の一部を明らかにすることができる。

degenerativeプライマーFY：GTGAATGCTGTGTACTTAAAGGCAANTGN/配列番号：3

(172VNAVYFKGK180に相当)、

degenerativeプライマーR21：AANAGRAANGGRTCNGC/配列番号：4

(Rは、AまたはG：357ADHPFLF363に相当)

しかしこのプライマーの組み合わせではcDNAの一部しか増幅することはできないので、更に5'側の領域を得るためには、ラットメグシントタンパク質のクローン

断片から遺伝子特異的プライマーを調製し、再度degenerate PCRを行う。このときに利用するメグシタンパク質のN末端付近のアミノ酸配列に相当するプライマーの塩基配列は以下のとおりである。

degenerativeプライマーRM-CtermC1: ATGGCNTCNGCNGCNGCNGCNAAYGC/配列番号: 5 (YはTまたはC、メグシタンパク質をコードする配列のN-末端に対応する)  
 RM-MR-A2: CGACCTCCAGAGGCAATTCCAGAGAGATCAGCCCTGG/配列番号: 6  
 RM-MR-A1: GTCTTCCAAGCCTACAGATTTCAAGTGGCTCCTC/配列番号: 7

(いずれもラットメグシタンパク質特異的reverseプライマーである)

得られたPCR産物をpGEM-T-easyベクター(Promega製)に組み込み、その塩基配列を明らかにすればラットのホモログをコードするcDNAの3'領域を得ることができる。こうして得られた塩基配列を基にデザインされたプライマーを使って、5'-RACEおよび3'-RACE法を行えば、最終的にはホモログをコードするcDNA全長の塩基配列を決定することができる。なおラットの場合、5'-RACEには、2種の遺伝子特異的アンチセンスプライマーRM-PR01: GCTCAGGGCAGTGAAGATGCTCAGGGAAGA/配列番号: 8 およびRM-PR02: CTGACGTGCACAGTCACCTCGAGCACC/配列番号: 9 を用いることができる。一方、3'-RACEには、遺伝子特異的センスプライマーRM-MR-S3: GAGGTCTCAGAAGAAGGCACTGAGGCAACTGCTGCC/配列番号: 10 を使用することができる。マウスにおいても、同様の手法によってホモログの単離が可能である。配列番号: 15 (ラット) および配列番号: 17 (マウス) に示したラットとマウスにおけるメグシタン cDNA の塩基配列は、このような手法に基づいて明らかにされたものである。

#### 【0012】

本発明において用いられるメグシタンパク質の測定法は制限されない。たとえば、メグシタンパク質に対する抗体と、メグシタンパク質との免疫学的反応を応用した免疫学的測定方法は特異性と感度の点で優れている。このような例としては、免疫沈降、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光分析、エンザイムイムノアッセイ、化学発光分析、イムノヒストケミスト(Immunohistochemist)分析が含まれる。またメグシタンパク質に対する抗体を利用して、ウェスタンブロット法によりメグシタンパク質を測定することもできる。また、これらのイムノ

アッセイは、例えば免疫沈降とその後のウェスタンブロット法のように組み合わせて用いることもできる。これらの分析手段は、当該技術分野において公知である。

イムノヒストケミスト（免疫組織染色）とは、分離したヒトの細胞あるいはその破碎液、組織あるいはその破碎液、血清、胸水、腹水、眼液などに本発明の抗体を反応させ、さらにフルオレシニンイソチオシアネート（FITC）などの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素標識を施した抗マウス IgG 抗体あるいは結合断片を反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法である。各標識物質は、ビオチン化した抗体にストレプトアビジン結合標識物質を結合させることによって間接的に標識することもできる。その他メグシンタンパク質がプロテアーゼインヒビターであることから、プロテアーゼの阻害活性を指標として検出することが可能である。あるいは、プロテアーゼに対する親和性を利用してメグシンタンパク質の測定を実施することができる。

#### 【0013】

メグシンタンパク質の免疫学的な測定方法に必要な抗体は、検出対象であるメグシンタンパク質を認識することができるものであれば、その由来や調製方法は限定されない。したがって、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、あるいはそれらの混合物等を利用することができる。また、抗体分子の可変領域を含む断片を利用することもできる。メグシンタンパク質の抗体は、たとえば以下のようにして得ることができる。本発明に用いる抗体には、例えば、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質に対する抗体が含まれる。メグシンタンパク質またはその部分アミノ酸配列に対する抗体（例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体）、あるいは抗血清は、メグシンタンパク質、その部分アミノ酸配列を含むオリゴペプチド、あるいは c-myc-(His)<sub>6</sub>-Tag-メグシンタンパク質や MBP-メグシンタンパク質のような融合タンパク質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。例えば、モノクローナル抗体は、後述の方法に従って製造することができる。なお部分アミノ酸配列を有する合成ペプチドを免疫原とする場合には、できるだけメグシンタンパク質に特異的に存在し、かつ親水性の高い部分のアミノ酸配列を利用する

のが一般に有利である。このようなアミノ酸配列としては、実施例で利用した配列番号：11～配列番号：14に示すようなアミノ酸配列を挙げることができる。

#### 【0014】

本発明のメグシンタンパク質、または本発明のメグシンタンパク質の部分アミノ酸配列を有する合成ペプチドは、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体または担体、希釈剤と共に投与される。合成ペプチドは、ウシチログロブリンやキーホールリンペットヘモシアニンのような担体タンパク質と結合させたものを免疫原として使用する。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントとともに投与することができる。投与は通常1～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後述の標識化メグシンタンパク質と抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。

#### 【0015】

本発明によるモノクローナル抗体は、メグシンタンパク質に特異的なエピトープを認識するものを選択することによって他のタンパク質と交差しないものとすることができる。一般的に、そのタンパク質を構成するアミノ酸配列の中から、連続する少なくとも7以上のアミノ酸残基、望ましくは10～20アミノ酸のアミノ酸配列によって提示されるエピトープは、そのタンパク質に固有のエピトープを示すといわれている。したがって、たとえば配列番号：2（ヒト）、配列番号：16（ラット）、および配列番号：18（マウス）のいずれかに記載されたアミノ酸配列から選択され、かつ連続する少なくとも7アミノ酸残基からなるア

ミノ酸配列を持つペプチドによって構成されるエピトープを認識するモノクローナル抗体は、メグシンタンパク質特異的なモノクローナル抗体といえる。配列番号：2、配列番号：16（ラット）、および配列番号：18（マウス）に記載されたアミノ酸配列の間で保存されたアミノ酸配列を選べば、メグシンタンパク質ファミリーに共通のエピトープを選択することができる。あるいは各配列に特異的なアミノ酸配列を含む領域であれば、種間の識別が可能なモノクローナル抗体を選択することができる。

抗メグシンタンパク質モノクローナル抗体の分離精製は通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法に従って行われる。公知の精製法としては、例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例えばDEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲル濾過法、抗原結合固相またはプロテインAまたはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法のような手法を示すことができる。

#### 【0016】

このようにして得られたメグシンタンパク質を認識するモノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体は、メサンギウム細胞に関連する疾病の診断等に利用することが可能である。これらの抗体を用いてメグシンタンパク質を測定する方法としては、不溶性担体に結合させた抗体と、標識分子を結合した標識化抗体とによりメグシンタンパク質を反応させて生成したサンドイッチ錯体を検出するサンドイッチ法、また、標識ヒト尿由来メグシンタンパク質と検体中のヒト尿由来メグシンタンパク質を抗体と競合的に反応させ、抗体と反応した標識抗原量から検体中のヒト尿由来メグシンタンパク質を測定する競合法を利用して検体中のヒト尿由来メグシンタンパク質を測定することができる。

サンドイッチ法によるヒト尿由来メグシンタンパク質の測定においては、まず、固定化抗体とヒト尿由来メグシンタンパク質とを反応させた後、未反応物を洗浄によって完全に除去し、標識化抗体を添加して固定化抗体-ヒト尿由来メグシンタンパク質標識化抗体を形成させる2ステップ法若しくは固定化抗体、標識化抗体及びヒト尿由来メグシンタンパク質を同時に混合する1ステップ法などを用



いることができる。

【0017】

測定に使用される不溶性担体は、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリル酸エステル、ナイロン、ポリアセタール、フッ素樹脂等の合成樹脂、セルロース、アガロース等の多糖類、ガラス、金属などが挙げられる。不溶性担体の形状としては、例えば粒子状、トレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管等の種々の形状を用いることができる。抗体を吸着した担体は、適宜アジ化ナトリウム等の防腐剤の存在下、冷所に保存する。

一方、ヒト精子の受精能を評価するための試薬として、固体顆粒の表面に、先体反応後のヒト精子と特異的に反応するモノクローナル抗体を結合してなる、精子受精能検出用顆粒が知られている（特許第2651249号）。この検出用顆粒は、先体反応後のヒト精子と特異的に反応するモノクローナル抗体を固体顆粒に結合させてものである。これに精子を結合させて、結合した精子を計数することにより、ヒト精子の受精能を評価することができる。放射能、蛍光などの煩雑な測定手段を必要とせず、短時間で容易・確実に受精能の試験が可能である。また、磁性を有する固体顆粒を用いる場合は、磁石により容易に固体顆粒を集束させることができ、微量サンプルの測定も可能となる。本発明者は、この技術をメグシンタンパク質の検出に適用することにより、より簡便かつ正確なメグシンタンパク質の検出が可能になることを見出した。

【0018】

抗体の固相化は、公知の化学結合法又は物理的吸着法を用いることができる。化学的結合法としては例えばグルタルアルデヒドを用いる方法、N-スクシニミジル-4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート及びN-スクシニミジル-2-マレイミドアセテートなどを用いるマレイミド法、1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸などを用いるカルボジイミド法が挙げられる。その他、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル法、N-サクシミジル-3-（2-ピリジルジチオ）プロピオン酸法、ビスジアゾ化ベンジジン法、ジパルミチルリジン法が挙げられる。あるいは、先に被検出

物質とエピトープの異なる2種類の抗体を反応させて形成させた複合体を、抗体に対する第3の抗体を上記の方法で固相化させておいて捕捉することも可能である。

【0019】

標識物質は、免疫学的測定法に使用することができるものであれば特に限定されない。具体的には、酵素、蛍光物質、発光物質、放射性物質、金属キレート等を使用することができる。好ましい標識酵素としては、例えばペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ-5-ステロイドイソメラーゼ、 $\alpha$ -グリセロールホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、西洋わさびパーオキシダーゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、およびアセチルコリンエステラーゼ等が挙げられる。好ましい蛍光物質としては、例えばフルオレセインイソチアネート、フィコビリプロテイン、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、およびオルトフタルアルデヒド等が挙げられる。好ましい発光物質としてはイソルミノール、ルシゲニン、ルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩及びその修飾エステル、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、およびエクオリン等が挙げられる。そして好ましい放射性物質としては、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{127}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、あるいは $^{35}\text{S}$ 等が挙げられる。

【0020】

前記標識物質を抗体に結合する手法は公知である。具体的には、直接標識と間接標識が利用できる。直接標識としては、架橋剤によって抗体、あるいは抗体断片と標識とを化学的に共有結合する方法が一般的である。架橋剤としては、N,N'-オルトフェニレンジマレイミド、4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、6-マレイミドヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、4,4'-ジチオピリジン、その他公知の架橋剤を利用することができる。これらの架橋剤と酵素および抗体との反応は、それぞれの架橋剤の性質に応じて既知の方法に従って行えばよい。この他、抗体にビオチン、ジニトロフェニル、ピ

リドキサール又はフルオレサミンのような低分子ハプテンを結合させておき、これを認識する結合成分によって間接的に標識する方法を採用することもできる。ビオチンに対してはアビジンやストレプトアビジンが認識リガンドとして利用される。一方、ジニトロフェニル、ピリドキサル又はフルオレサミンについては、これらのハプテンを認識する抗体が標識される。

抗体を標識する場合、西洋わさびペルオキシダーゼを標識化酵素として用いることができる。本酵素は多くの基質と反応することができ、過ヨウ素酸法によって容易に抗体に結合させることができるので有利である。また、抗体としては場合によっては、そのフラグメント、例えばFab'、Fab、F(ab')<sub>2</sub>を用いる。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体にかかわらず同様の処理により酵素標識体を得ることができる。上記架橋剤を用いて得られる酵素標識体はアフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法にて精製すれば更に感度の高い免疫測定系が可能となる。精製した酵素標識化抗体は、防腐剤としてチメロサル(Thimerosal)等を、そして安定剤としてグリセリン等を加えて保存する。標識化抗体は、凍結乾燥して冷暗所に保存することにより、より長期にわたって保存することができる。

#### 【0021】

標識化剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤が用いられる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質溶液としてH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を用い、発色剤として2,2'-アジノージ-[3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸]アンモニウム塩 (ABTS)、5-アミノサリチル酸、オルトフェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン等を使用することができる。酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合は、基質としてオルトニトロフェニルフォスフェート、パラニトロフェニルリン酸等を使用することができる。酵素にβ-D-ガラクトシダーゼを用いる場合は基質としてフルオレセイン-ジ- (β-D-ガラクトピラノシド)、4-メチルウンベリフェニル-β-D-ガラクトピラノシド等を使用することができる。本発明は、また、前述のモノクローナル抗体、あるいはポリクローナル抗体を標識して、あるいは固相化してメグシタンパク質の免疫学的測定用試薬としたもの、更にはこの試薬に標識検出

用の指示薬や対照試料等をキット化したのものをも含むものである。

本発明におけるメグシタンパク質の測定対象は、血漿、血清、血液、尿、組織液、あるいは脳脊髄液等の体液等、メグシタンパク質、あるいはメグシタンパク質の前駆体や断片を含む生体試料であれば限定されない。これらの生体試料の中でも特に尿においては、メサンギウム細胞の増殖や活性化に伴って高い頻度でメグシタンパク質が検出されるようになる。したがって、尿中メグシタンパク質の測定は、IgA腎症などのメサンギウム増殖性腎症のマーカーとして有用である。

#### 【 0 0 2 2 】

本発明において腎機能の評価とは、腎臓組織を構成する重要な細胞であるメサンギウム細胞の状態を把握し、メサンギウム細胞に異常を生じる腎疾患の有無、あるいはその程度を知ることの意味する。本発明における腎疾患とは、メサンギウム細胞に異常を伴う全ての疾患を包む。具体的には、I g A 腎症、急性糸球体腎炎、巣状糸球体硬化症、膜性増殖性糸球体腎炎、糖尿病性腎炎、およびループス腎炎などが挙げられ、かかる腎疾患により変化した腎機能の状態が本発明の方法によって評価することができる。本発明による腎機能の評価方法は、これらの疾患の中でも I g A 腎症のようなメサンギウム細胞増殖性腎症のマーカーとして特に有用である。また、本発明の腎機能評価方法は、腎疾患の有無や程度の判定の他、治療効果の評価や予後の判定に適用することができる。更に、本発明による腎機能の評価方法によれば、尿タンパクの検査で陽性を示す検体についてメグシタンパク質の量を測定することにより、メサンギウム細胞の増殖に起因しない急性腎盂腎炎、慢性腎盂腎炎、微小変化型ネフローゼ症候群、慢性糸球体腎炎、および腎アミロイドーシスなどの疾患を除外することができる。

#### 【 0 0 2 3 】

本発明に基づいて、腎機能の評価を行うには、腎機能进行评估すべき個体の生体試料を採取し、これに含まれるメグシタンパク質の濃度を先に述べたような方法に基づいて測定する。そして望ましくは、濃度と体液の体積とからメグシタンパク質の量を明らかにし、正常者の値と比較する。メグシタンパク質の量を求めるには、尿を試料として用いる場合には、たとえば 1 日分の尿をプールして

尿量を測定すれば、尿における 1 日あたりのメグシントタンパク質の量を明らかにすることができる。あるいは、随時尿を試料とした場合であっても、クレアチニン補正によって量に類する値を推定することもできる。クレアチニン補正とは、クレアチニンの濃度に基づいて尿量の変動による測定対象成分の希釈（または濃縮）の影響を補正する手法である。1 日当たりの尿へのクレアチニン排泄量が一定であることに基づいて、クレアチニンの濃度から随時尿が 1 日における尿の総排泄量に占める割合を算出し、同じ尿から得られた測定対象成分の濃度を 1 日当たりの総排泄量に換算することができる。また血液においては、体重補正などの腎機能診断の際に一般的に使用される数値補正を適用して量の推定が可能である。体重補正とは、血液を採取した個体の体重から推測される血液の体積に基づいて、血液中成分の量を算出する手法である。

この他に、ある個体に由来する生体試料のメグシントタンパク質濃度の変動を観察すれば、量への換算を行わなくても腎機能の変化を経時的に追跡することができる。あるいは、特定の種、あるいは人種などの集団における体液試料のメグシントタンパク質濃度の正常値を予め設定しておき、特定の個体のメグシントタンパク質濃度（または量）と比較することにより、腎機能の異常の有無を知ることができる。

本発明において、生体試料としては、尿や血液を用いることができる。中でも尿は、非侵襲的に採取することができ、腎機能の状態を直接的に反映する好ましい試料である。血液の採取は若干の侵襲を伴うものの、メグシントタンパク質が腎臓に特異的なタンパク質であることから、その測定値の異常は、腎機能の異常と密接に関連している。したがって、腎機能の指標として高い特異性を期待することができる。たとえば、現在広く行われている尿タンパク質を指標とする腎機能障害のスクリーニングに比べ、メグシントタンパク質を指標とすることで、より特異的で感度に優れるスクリーニングが期待できる。以下に、モノクローナル抗体を利用したメグシントタンパク質の免疫学的な測定方法に基づいて尿中のメグシントタンパク質を測定し腎機能を評価するための具体的な操作について詳細に説明する。

【0024】

## (A) 抗体の製造

### (1) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

動物の免疫は、例えば次のように行う。公知の方法（例えば、T.Miyata et al., J.Clin.Invest., 第120巻, 828-836頁, 1998年）に従って精製したヒトメグシンタンパク質をラット、マウスなどの哺乳類動物に免疫する。哺乳類動物は細胞融合する際の相手の永久増殖性細胞と同系統の動物を用いるのが好ましい。動物の週令は、例えばマウスでは8～10週令が好適である。性は雌雄何れでも構わない。免疫の方法は、精製したヒトメグシンタンパク質を適当なアジュバント（例えばフロイント完全アジュバントまたは水酸化アルミニウムゲル-百日咳菌ワクチンなど）と混合しエマルジョンとした後、動物の皮下、腹腔内、静脈内などに投与する。以後、この免疫操作を1～2週間間隔で2～5回行う。最終免疫は、0.5～2  $\mu$ gのヒトメグシンタンパク質を動物の腹腔内に投与することにより行う。このようにして免疫した動物の体液からは、ポリクローナル抗体が得られる。各免疫操作後3～7日後に眼底静脈叢より採血し、その血清の抗体価を以下に示すプロテインAロゼットアッセイ法（Eur.J.Immunol., 第4巻, 500-507頁, 1974年）により測定し、抗体価が充分上昇したとき、抗体または抗体産生細胞を採取する。

#### 【0025】

プロテインAロゼットアッセイ法は、例えば、72穴のテラサキプレート（ファルコン製）にヒト赤芽球性細胞株K562（ジャパニーズ・キャンサー・リサーチ・リソーシズ・バンク（JCRS）製）をコートし、PBS（リン酸二ナトリウム2.90g、リン酸一カリウム0.20g、塩化ナトリウム8g、塩化カリウム0.2g、蒸留水1L）で希釈した試料を加え、CO<sub>2</sub>インキュベーター内に37℃で30分間放置する。そして、PBSで洗浄後、プロテインA（アマシヤム・ファルマシア・バイオテック製）をコートしたヒツジ赤血球を加えてロゼットの形成を顕微鏡で観察することによって実施される。

上記のようにヒトメグシンタンパク質で免疫した動物から抗体産生細胞を採取する。抗体産生細胞は、脾臓、リンパ節、末梢血などから得ることができるが、特に脾臓が好ましい。例えば、最終免疫の3～4日後に脾臓を無菌的に摘出し、

Minimal Essential Medium (MEM) 培地 (日水製薬製) 中で細断し、ピンセットで解し、1200rpm×5分間の条件で遠心分離させた後、上清を除き、トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.65) で1~2分間処理して赤血球を除去し、さらにMEM培地で3回洗浄して細胞融合用脾臓細胞を得る。

【0026】

## (2) 永久増殖性細胞の調製

融合される相手方の永久増殖性細胞には、永久増殖性を有する任意の細胞を用いることができるが、一般的には骨髓腫細胞が用いられる。永久増殖性細胞は抗体産生細胞と同種の動物由来のものを用いるのがよい。例えばマウスの場合、8-アザグアニン耐性マウス (BALB/c) 由来骨腫瘍細胞株として次のような細胞株が知られている。

P3-X63Ag8-U1 (P3-U1) (Current Topics in Microbiol. Immunol., 第81巻, 1-7頁, 1978年)、

P3/NS1/1-Ag4-1 (NS-1) (Eur. J. Immunol., 第6巻, 511-519頁, 1976年)、

SP2/0-Ag14 (SP-2) (Nature, 第276巻, 269-270頁, 1978年)、

P3-X63-Ag8653 (653) (J. Immunol., 第123巻, 1548-1550頁, 1979年)、および

P3-X63-Ag8 (X63) (Nature, 第256巻, 495-497頁, 1975年)

これらの永久増殖性細胞株は、8-アザグアニン培地 (RPMI-1640培地にグルタミン (1.5 mM)、2-メルカプトエタノール ( $5 \times 10^{-5}$  M)、ゲンタマイシン (10  $\mu$ g/mL) およびウシ胎児血清 (FCS、CLS製) (10%) を加えた正常培地に、さらに8-アザグアニン (15  $\mu$ g/mL) を加えた培地で継代培養し、細胞融合の3~4日前に正常培地に継代し、融合当日  $2 \times 10^7$  個以上の細胞数を確保する。

【0027】

## (3) 細胞融合

細胞融合は例えば次のように行う。(1) で得られた抗体産生細胞と(2) で用意した永久増殖性細胞をMEM培地またはPBSでよく洗浄し、細胞数が5~

10:1の比になるように混合する。1200rpm×5分間遠心分離した後、上清を除き、沈殿した細胞群をよく解した後、攪拌しながら37℃に保ちつつ、ポリエチレングリコール-1000 (PEG-1000) 1~4g、MEM培地1~4mLおよびジメチルスルホキシド0.5~1.0mLの混液0.1~1.0mL/10<sup>8</sup>個細胞を加えて細胞融合を起こさせる。その後、10分毎にMEM培地3mLを数回添加し、MEM培地を全量が50mLになるように加えて希釈し、細胞融合を停止させる。次に、遠心分離(1500rpm×5分間)して上清を除去し、緩やかに細胞を解した後、正常培地(RPMI-1640培地、10%FCS)100mLを加え、メスピペットによるピペッティングで緩やかに細胞を懸濁する。この懸濁液を96ウエルの培養用プレートに100μL/wellずつ分注し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37℃で3~5日間培養する。培養プレートに100μL/wellのHAT培地(正常培地にヒポキサンチン( $10^{-4}$ M)、チミジン( $1.5 \times 10^{-5}$ M)およびアミノプテリン( $4 \times 10^{-7}$ M)を添加した培地)を加え、さらに3日間培養する。以後3日間毎に培養上清の半容量を除去し、新たに同量のHAT培地を加え、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37℃で約2週間培養する。

## 【0028】

## (4) ハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニング

融合細胞がコロニー状に生育しているのが認められるウェルについて、上清の半容量を除去し、HT培地(HAT培地からアミノプテリンを除いたもの)を同量加え、4日間培養する。培養上清の一部を採取し、前述のプロテインAロゼットアッセイ法によりメグシンタンパク質に対する抗体価を測定する。抗体価は、例えばメグシンタンパク質抗原を直接又は担体と共に吸着させた固相(例えば、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合した抗メグシンタンパク質モノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体又はプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したメグシンタンパク質を加え、固相に結



合した抗メグシンタンパク質モノクローナル抗体を検出する方法等によって確認することもできる。

メグシンタンパク質に反応する抗体の産生が観察されたウエルにつき、限界希釈法によりクローニングを4回繰り返し、安定したメグシンタンパク質の抗体価を示すものを抗メグシンタンパク質モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

#### 【0029】

##### (5) モノクローナル抗体の調製

上記のようにして得られたハイブリドーマを *in vitro* および *in vivo* で培養することによりモノクローナル抗体を産生させる。 *in vivo* で培養する場合、任意の動物にハイブリドーマを移植するが、細胞融合に用いた脾臓細胞を採取した動物と同種の動物を使用するのが好ましい。例えば、プリスタン処理（2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン-プリスタン-0.5 mLを腹腔内投与し、2週間飼育する。）をした8~10週令のBALB/c雌マウスに（4）で得られた抗メグシンタンパク質モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞の  $2 \sim 4 \times 10^6$  個/匹腹腔内投与する。2~3週間でマウスの腹腔内にモノクローナル抗体を高濃度に含んだ腹水が貯留し腹部が肥大してくる。このマウスから腹水を採取し、遠心分離（3000 rpm×5分間）して固形分を除去し、IgGを精製する。一方ハイブリドーマの *in vitro* での培養は、好ましくは無血清培地中で行われ、至適量の抗体をその上清に与える。腹水や培養上清を50%硫酸アンモニウムを用いて塩析し、PBSで1~2週間透析する。この透析画分をプロテインAセファロースカラムに通し、IgG画分を集め、精製モノクローナル抗体を得る。

抗体のイソタイプは、オクタロニイ（二重免疫拡散）法（免疫学実験入門，生物化学実験法15，学会出版センター刊，74頁，1981年）により決定した。タンパク質量は、フォーリン法および280 nmにおける吸光度（1.4 (OD<sub>280</sub>) ≡ イムノグロブリン 1 mg/mL）により算出する。

#### 【0030】

##### (6) モノクローナル抗体の特性

上記のようにして得られたモノクローナル抗体の特性は、例えば、（1）細胞

表面をヨウ素ラベルした H S B - 2、K 5 6 2 などのヒトリンパ球由来の細胞株を用いる免疫沈降反応 (J. Immunol., 第138巻, 2850-3855頁, 1987年) および (2) 酵素免疫測定法 (E L I S A 法) (J. Immunol., 第142巻, 2743-2750頁, 1989年) 等により明らかにすることができる。

【 0 0 3 1 】

(7) 標識結合モノクローナル抗体の調製

得られた精製モノクローナル抗体は、グルタルアルデヒド法 (Immunochem., 第6巻, 43頁, 1969年)、過ヨウ素酸法 (J. Histochem. Cytochem., 第22巻, 1084頁, 1974年)、マレイミド法 (J. Biochem., 第79巻, 233頁, 1976年)、ピリジル・ジスルフィド法 (Biochem. J., 第173巻, 723頁, 1978年) などの方法により、酵素標識することができる。

例えば、過ヨウ素酸法を用いた場合、ペルオキシダーゼ溶液 (4 mg/mL) に 50  $\mu$ L の過ヨウ素酸 (38.5 mg/mL) を攪拌しながら加え、室温で 20 分間反応させた後、1 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) に置換した PD-10 (アマシャム・ファルマシア・バイオテック製) を用いて緩衝液交換を行う。次に 0.2 M の水酸化ナトリウム 40  $\mu$ L を加える。これに 10 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.5) で透析したモノクローナル抗体 10 mg を加え、室温で 2 時間反応する。反応終了後、氷冷し、100  $\mu$ L の水酸化ホウ素ナトリウム溶液 (4 mg/mL) を加え 2 時間反応させる。反応液を PD-10 を用いて PBS に交換した後、3000 rpm  $\times$  30 分間遠心分離し、上清をセファクリル S 200 HR 26  $\times$  30 (アマシャム・ファルマシア・バイオテック製) を用いてゲル濾過して、403 および 280 nm の吸光度を測定し標識モノクローナル抗体の画分を分取する。得られた分画にウシ血清アルブミン (10 mg/mL) を加え、-20  $^{\circ}$ C で保存し、使用直前に PBS-Tween (登録商標) 20 で希釈する。

【 0 0 3 2 】

(B) 検出用顆粒の製造

この発明で使用する検出用顆粒は、適当な顆粒、例えばクロマト用ゲルに、物理的または化学的に抗メグシンタンパク質抗体を結合させることによって製造することができる。化学的に活性化した顆粒に、本発明で用いる抗体を結合させる

方法は、結合安定性を期待できることから望ましい結合方法である。具体的には、p-トルエンスルフォニルクロライドによってトシル化活性された顆粒に、本発明で用いる抗体を結合させる方法を示すことができる。

顆粒としては、ガラス、アガロース、セファロース、アガロース充填多孔性珪藻土、親水性共重合アクリルゲル、ポリスチレン等からなる顆粒が用いられる。磁性を有する顆粒を使用すれば、磁石等を用いて顆粒を集束することができるので、微量サンプルの測定が可能となる。たとえば可磁性物質（例えば $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ）をコア内に含ませることにより超常磁性を持たせた顆粒とすることができる。このような顆粒は、免疫学的分析用の固相として市販されている。顆粒の形状は球形、不定破砕形等任意であるが、球形が好ましい。粒径は特に制限されず、例えば平均粒径 $5\sim 1000\mu\text{m}$ を示すことができる。また、反応液の比重（約1）よりも比重の大きな顆粒を用いた場合も顆粒の集束が容易となり、磁性を有する顆粒を用いたときと同様の効果が得られる。さらにこの場合、顆粒を集束するための遠心分離の条件を緩やかにできるため、結合が外れ易い抗体を使用する際にも有利である。

顆粒への抗メグシンタンパク質抗体の結合は、直接的な結合のみならず間接的な結合を利用することもできる。たとえば、マウスのモノクローナル抗体を用いる場合であればマウスのIgGを認識する抗体を顆粒に結合し、間接的に顆粒上にマウスの抗体を結合することができる。このような抗体は二次抗体と呼ばれている。間接的な結合には、二次抗体の他、イムノグロブリンの定常領域を結合するプロテインAやプロテインGの利用、あるいはビオチン化した抗体をアビチンを固定した顆粒で捕捉する方法等を応用することもできる。上記のような顆粒に二次抗体、プロテインAまたはプロテインGを化学的に結合させるには、顆粒を活性化させてから結合させるのが好ましい。顆粒の活性化は、この種の顆粒にタンパク質を結合させる際の任意の活性化法を選択することができる。このような活性化法には、トシルクロライド法、ブロムシアン法、ブロムアセチル法、グルタルアルデヒド法等がある。活性化顆粒の中には市販されているものもある。このような活性化、および活性化顆粒と二次抗体、プロテインAまたはプロテインG等のタンパク質との結合は、常法によって行うことができる。

【0033】

また、既に二次抗体、プロテインAまたはプロテインG等を結合した顆粒も市販されている。市販の顆粒としては、たとえば次のようなものが知られている。

日本ダイナル株式会社輸入、株式会社ベリタス販売のダイナビーズ（登録商標）

M-450、M-280

ヒツジ抗マウスIgGコートタイプ

ヤギ抗マウスIgGコートタイプ

ヒツジ抗ラットIgGコートタイプ

ヒツジ抗家兎IgGコートタイプ

ポリサイエンス・インコーポレイティッド製

ヤギ抗マウスIgG（H&L）カルボキシレートビーズ

ヤギ抗家兎IgG（H&L）カルボキシレートビーズ

プロテインAカルボキシレートビーズ

ヤギ抗家兎IgG（H&L）ミクロマグネットパーティクル

ヤギ抗家兎IgG（H&L）ミクロマグネットパーティクル

プロテインAミクロマグネットパーティクル

ヒツジ抗マウスIgG（H&L）ミクロマグネットパーティクル

上記のような顆粒に本発明で用いる抗体を結合させるには、適当な媒質中で懸濁した顆粒をタンパク質溶液で処理して非特異的吸着を防止した後、抗体を含む腹水または精製した抗体の溶液を混合する。

【0034】

（C）検出法

本発明の検出法を実施するには、被験者から血液または尿を採取し、遠心分離後の上清を検体とする。尿の遠心分離は沈殿を分離するために行うもので、静置後の上清やろ過によって沈殿を除いた尿試料を利用することもできる。前記のようにして製造した検出用顆粒に希釈した検体および（7）で得られた標識結合抗体を加え、室温で2時間インキュベーションする。反応終了後、洗浄し、基質液を加えて発色後、遠心分離して顆粒を除去し、上清をマイクロプレートに移し、吸光度を測定する。同様に正常者の検体も測定し、値を比較する。値の比較にあ

たつては、単にメグシンタンパク質の濃度としての比較の他に、その個体の体液の体積を乗じて得ることができるメグシンタンパク質の体液中の絶対量、あるいはそれに類する補正值に基づく比較を行うこともできる。

【0035】

#### (D) キット

上記の試験を実施するために必要な材料は、キットとして供給することができる。このようなキットは、前述した抗体を固定化した検出用顆粒および磁石を含むことができる。さらに標識分子を結合した抗体を含むこともできる。そのほか、本発明によるキットには、試験管、遠心管、その他類似の容器、ピペットまたは類似の吸引器具、あるいは顕微鏡を含ませることができる。あるいはまた、標識を検出するために必要な酵素基質、陽性や陰性の標準試料などを組み合わせることもできる。なお上記検出用顆粒の代わりに、その製造原料となる固体顆粒と抗体の組合せとすることもできる。以下、この発明を実施例によりさらに詳細に説明する。

【0036】

#### 【実施例】

【実施例1】メグシンタンパク質の合成ペプチドに対するポリクローナル抗体の製造

他のセルピンファミリーとの相同性が低く、かつ親水性を有する領域を免疫原として利用し、メグシンタンパク質に対するポリクローナル抗体を製造した。以下のアミノ酸配列からなるペプチドのN末端またはC末端にシステインを含有するペプチドを固相ペプチド法により合成した。

N末端からの位置      アミノ酸配列      配列番号/No.

16- 30	CFREMDDNQGNVFF	1 1 /1
72- 86	CSQSGLQSQLKRVFSD	1 2 /2
339-354	ATGSNIVEKQLPQSTLC	1 3 /3
342-356	CSNIVEKQLPQSTLFR	1 4 /342

各合成ペプチドとウシチログロブリン（シグマ社製）をN-(6-maleimidocaproyloxy) succinimide（同仁化学研究所製）を用いて結合させ、0.85% NaCl

溶液にて透析後、アジュバント (Difco 製) と充分混和し乳化させ、ウサギ皮下に投与した。初回免疫 ( $20 \mu\text{g}/\text{羽}$ ) 後 3 週間後に 2 回目 ( $50 \mu\text{g}/\text{羽}$ ) の免疫を行い、以後 2 週間毎に 4 回免疫 ( $50$ 、 $100$ 、 $200 \mu\text{g}/\text{羽}$ ) を行った。アジュバントは初回のみフロインド完全アジュバントで、2 回目以降はフロインド不完全アジュバントを用いた。41 日後、55 日後、採血で得た血清が合成ペプチドと反応することを確認するため、血清の抗体価を酵素免疫測定法 (ELISA) により評価した。抗原  $50 \text{ ng}/\text{well}$  を固相化した 96 穴プレートに連続的に希釈した抗血清を各ウエルに  $100 \mu\text{L}$  加えて一次反応を行い、洗浄後、二次反応として HRP 結合ヤギ抗ウサギ IgG (カッセルプロダクト製) を反応させた。洗浄後、基質としてオルトフェニレンジアミン (和光純薬製) を用い発色させ吸光度  $492 \text{ nm}$  で測定し、抗体価が上昇していることを確認した。

#### 【0037】

〔実施例 2〕 メグシンタンパク質の合成ペプチドに対するポリクローナル抗体の精製法

メグシンタンパク質の各合成ペプチドに対するポリクローナル抗体は、公知の方法 (細胞工学別冊 実験プロトコルシリーズ 抗ペプチド実験プロトコル、秀潤社) に従ってイムノアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。操作は、次のとおりである。各合成ペプチドを FMP (2-fluoro-1-methylpyridinium toluene-4-sulfonate) 活性化セルロファイン (生化学工業製) に固定化し、アフィニティーカラムを作製した。抗体は、メグシンタンパク質を免疫し抗体価の上昇したウサギ血清を PBS (-) で希釈したのち、ペプチドカラムを用いてアフィニティー精製した。得られた精製抗体はウエスタンブロットによりメグシンタンパク質融合タンパク質と反応することを確認し、メグシンタンパク質に特異的であることを証明した。(図 1-図 3)

#### 【0038】

〔実施例 3〕 ウサギポリクローナル抗メグシンペプチド IgG の反応性の検討

以下のような各種タンパク質を抗原として用い、メグシンペプチドを免疫原とするウサギ IgG の反応性を確認した。MBP-メグシンタンパク質と His-メグシンタンパク質は次のように調製した。すなわち、まず配列番号: 1 に示す

メグシン遺伝子の塩基配列に基づいてそのコード領域をPCRによって増幅した。この増幅産物を、マルトース結合タンパク質融合タンパク質発現用ベクター、pMAL-c (New England Biolab社) に組み込むことによってMBPとメグシントタンパク質との融合タンパク質を発現するベクターを得た。このベクターで大腸菌を形質転換し、その細胞破壊液からアミロース樹脂等を利用したアフィニティクロマトグラフィーによって発現産物を精製しMBP-メグシントタンパク質とした。他方His-メグシントタンパク質を得るために、ヒスチジンタグとの融合タンパク質としてインサートを発現するベクターptrcHisA (Invitrogen製) に前記メグシン遺伝子の増幅産物を組み込んだ融合タンパク質発現ベクターを構築した。このベクターを大腸菌JM109に形質転換し、IPTGで発現を誘導後に細胞破碎液からニッケルカラム等によって精製した融合タンパク質としてHis-メグシントタンパク質を得た。

メグシントタンパク質(+)ウイルス感染カイコ体液とは、公知の方法(J. General Virology, 第78巻、3073-3080頁、1979)に従ってメグシン遺伝子導入ウイルスを感染させたカイコの体液である。一方、メグシントタンパク質(-)ウイルスとは、メグシン遺伝子を導入していないウイルスベクターのみを感染させたカイコの体液である。これらの各種メグシン組み換え体の構築に必要なメグシンをコードする遺伝子は、PCRによってメサングウム細胞のmRNAを鋳型として合成することもできるし、あるいは本発明者が構築したメグシン遺伝子クローニングベクター(受託番号FERM BP-6518)から得ることもできる。

その他、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1(PAI I)、MBP-プラスミノゲンアクチベーターインヒビター2融合タンパク質(MBP-PAI II)等に対する反応性も観察した。これらのタンパク質は、メグシントタンパク質とある程度の相同性を持つタンパク質で、抗体の交差反応性の確認を目的として選択した。

MBP-メグシントタンパク質、

His-メグシントタンパク質、

MBP-PAI II、

PAI I、

CHO細胞で発現させたメグシンタンパク質、  
メグシンタンパク質(+)ウイルス感染カイコ体液、  
メグシンタンパク質(-)ウイルス感染カイコ体液、  
非ウイルス感染カイコ体液、および  
ヒト血清アルブミン

【0039】

それぞれのタンパク質溶液を等量のサンプルバッファー(0.25%トリス-HCl、2%SDS、30%グリセリン、10%β-メルカプトエタノール、0.025%ブロモフェノールブルー)(第一化学薬品製)で処理し、5分間100℃で加熱し、ゲル濃度4~20%のグラジエントゲル(第一化学薬品製)を用いてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)(Laemmli, U.K., Nature, 第227巻, 680-685頁, 1970年)により分離した。SDS-PAGEで分離したタンパク質を、ブロッティング溶液(25mMトリス-HCl、192mMグリシン、20%メタノール、pH8.3)を用いて100Vの定電圧で1時間、ポリビニリデンジフルオリド(PVDF)膜(バイオ・ラッド製)にブロッティングを行った。ブロッティングしたPVDF膜を蒸留水で洗浄後、5%ブロックエースのTTBS溶液中で3時間ブロッッキングした。次に、PVDF膜をTTBS(20mMトリス、500mMのNaCl、0.05%Tween 20、pH7.5)で洗浄した後、TTBSで希釈した1次抗体であるウサギポリクローナル抗メグシンペプチドIgGの溶液と4℃で一夜反応させた。次に、アンプリファイドアルカリフォスファターゼイミュンブロットキット(バイオ・ラッド製)を用いて検出した。すなわち、TTBSで希釈したビオチン標識ヤギ抗ウサギIgGと室温で1時間インキュベートした後、あらかじめ室温でstreptavidinとビオチン標識アルカリフォスファターゼを1時間インキュベートして調製したstreptavidin-ビオチン標識アルカリフォスファターゼのコンプレックスを反応させた。PVDF膜をTTBSで洗浄し、基質(nitro blue tetrazoliumと5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, p-toluidine塩の溶液)と室温で約30分間インキュベートすることにより、1次抗体に結合された抗体を可視化した。蒸留水で十分反応させることにより、反応を停止させた。



## 【0040】

## 【実施例4】アフィニティー精製抗メグシンペプチドIgGの酵素標識

実施例2で得たアフィニティー精製抗メグシンペプチドIgGを市販の標識キット（APラベリングキット：ペーリンガー・マンハイム製）を用い、キットの指示に従ってアルカリフォスファターゼで標識した。また、ビオチン標識は標識キット（ECL protein biotinylation module：アマシャム ファルマシア バイオテク製）を用いてキットの指示に従った。

## 【0041】

## 【実施例5】ELISAによる尿中メグシタンパク質の測定

正常者16人、IgA腎症患者24人、および微小変化型ネフローゼ症候群患者24人の尿を遠心し、不溶物を除いた後、分画分子量5000の限外濾過膜（ミリポア製ウルトラフリー）を用いて濃縮した。ウサギポリクローナル抗メグシンペプチド2のIgGをコートした96穴ELISA用プレートの各ウェルに、PBS（-）を120μLずつ分注後、濃縮した尿を120μL分注し、4℃で一夜放置した。PBS（-）で洗浄し、ブロックエース（大日本製薬製）を加えて室温で2時間ブロッキングをした後、0.05%（w/v）Tween 20（和光純薬製）含有PBS（-）（Tween-PBS）で洗浄し、アルカリフォスファターゼ標識ウサギポリクローナル抗メグシンペプチド1抗体を加え、室温で1時間放置した。Tween-PBSで洗浄した後、発色基質溶液（1mg/mLオルトフェニレンジアミン（和光純薬製）-1Mジエタノールアミン（和光純薬製）緩衝液（pH9.8））を100μL/wellずつ加えた。室温で反応させた後、1N水酸化ナトリウムを50μL/wellずつ加えて反応を停止させ、マイクロプレートリーダー（Molecular Devices製 Spectra MAX 250）で吸光度（405nm）を測定し、検量線から尿中メグシタンパク質濃度を求めた。同じ尿試料について市販のクレアチニン測定用試薬（ダイヤ試薬製、自動分析機用測定試薬「ダイヤ」-Crea）によってクレアチニン濃度を求め、メグシタンパク質の量をクレアチニン比として補正した。結果を図4に示す。正常者とIgA腎症患者との間には $p < 0.001$ で、またIgA腎症患者と微小変化型ネフローゼ症候群患者との間でも $p < 0.001$ で有意差が認められた。

正常者と I g A 腎症患者との間に有意差が見られたことから、尿中メグシントタンパク質を測定することにより腎障害の発生を確認することができた。また、I g A 腎症患者と微小変化型ネフローゼ症候群患者との間でも有意差が認められたことから、本発明に基づいて尿中メグシントタンパク質を測定することにより両者の識別が可能ながことが明らかとなった。これらの疾患は、公知のスクリーニング方法である尿タンパク質を指標とする方法では、いずれも同様に陽性となるため、識別することができない。

またクレアチニン補正を行わない尿中メグシントタンパク質濃度の比較では、腎疾患患者で高値となる傾向は見られるものの、今回のような少ない例数によって統計学上の有意な差を証明することは困難と思われた。したがって、随時尿中のメグシントタンパク質の測定に基づいて本発明を実施する場合には、クレアチニン補正等の手法によって量の比較を行うことが望ましいと考えられる。

#### 【0042】

〔実施例 6〕尿中メグシントタンパク質のウエスタンブロッティングによる検出と定量

正常者 8 名、I g A 腎症患者 9 名の随時尿を遠心し、不溶物を除いた後、分画分子量 5000 の限外濾過膜（ミリポア製ウルトラフリー）を用いて濃縮した。濃縮尿と等量のサンプルバッファー（0.25% トリス-HCl、2% SDS、30% グリセリン、10%  $\beta$ -メルカプトエタノール、0.025% ブロモフェノールブルー）（第一化学薬品製）で処理し、5 分間 100℃ で加熱し、ゲル濃度 4~20% のグラジエントゲル（第一化学薬品製）を用いて SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（SDS-PAGE）（Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685）により分離した。SDS-PAGE で分離したタンパク質を、ブロッティング溶液（25mM トリス-HCl、192mM グリシン、20% メタノール、pH 8.3）を用いて 100V の定電圧で 1 時間、ポリビニリデンジフルオリド（PVDF）膜（バイオ・ラッド製）にブロッティングを行った。ブロッティングした PVDF 膜を蒸留水で洗浄後、5% ブロックエースの TTBS 溶液中で 3 時間ブロッッキングした。次に、PVDF 膜を TTBS（20mM トリス、500mM NaCl、0.05% Tween 20、pH 7.5）で洗浄し

た後、TTBSで希釈した1次抗体であるウサギポリクローナル抗メグシンペプチドIgGの溶液と4℃で一夜反応させた。

#### 【0043】

次に、アンプリファイドアルカリフォスファターゼイミュンブロットキット（バイオ・ラッド製）を用いて検出を行った。すなわち、TTBSで希釈したビオチン標識ヤギ抗ウサギIgGと室温で1時間インキュベートした後、あらかじめ室温でstreptavidinとビオチン標識アルカリフォスファターゼを1時間インキュベートして調製したstreptavidin-ビオチン標識アルカリフォスファターゼのコンプレックスを反応させた。PVDF膜をTTBSで洗浄し、基質（nitro blue tetrazoliumと5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, p-toluidine塩の溶液）と室温で約30分間インキュベートすることにより、1次抗体に結合された抗体を可視化した。蒸留水で十分反応させることにより、反応を停止させた。可視化したバンドについては、電気泳動画像処理装置（アトー製 AE-6920M-05型）と泳動・スポット画像解析ソフトウェア（アトー製 AE-6920WSE/MSE）を用いて定量を行った。結果（電気泳動像）は図5に示した。また、画像解析装置による測定結果は以下に示すとおりである。正常者の濃縮尿に比べてIgA腎症患者の濃縮尿で濃いバンドが確認された。そしてこのバンドの濃さを定量することにより、メグシンタンパク質の定量が可能なが確認された。

#### 画像解析装置による測定結果

レーン	測定結果
1	分子量マーカー
2	8.5
3	5.2
4	13.8
5	4.8
6	32.8
7	15.1

#### 【0044】

#### 【実施例7】 検出用顆粒の製造

市販の磁性顆粒に、抗メグシンペプチドIgGを、抗マウスIgG抗体を介して結合させることにより、本発明による検出用顆粒を製造した。操作は次のとおりである。顆粒としてダイナビーズ（登録商標）M-450トシルアクティベィッド（トシル活性化された均一な常磁化ポリスチレン顆粒：日本ダイナル製）を用い、その1mM塩酸懸濁液を無菌蒸留水で1回洗浄し、更に0.2Mホウ酸緩衝液（pH9.5）で洗浄した。次に抗メグシンペプチドIgG抗体を0.2Mホウ酸緩衝液（pH9.5）に150μg/mLの濃度に溶解した液を、等容量の活性化顆粒懸濁液に加えた（抗体／顆粒=75μg/15mg）。ゆっくり攪拌しながら22℃で24時間インキュベートした。磁石を用いて抗体結合顆粒を集め、磁石に顆粒を付けたまま上清を除き、

- (1) 5mLの0.1MPBS（pH7.0）で10分間、
- (2) 5mLの1Mエタノールアミン-塩酸（pH9.5）で2時間、
- (3) 0.1M塩化ナトリウム、0.1%ウシ血清アルブミン（BSA）、および0.1%Tween20を含有する0.05Mトリス（pH7.5）の5mLで12時間、および
- (4) Tween20を含まない（3）の緩衝液5mLで2時間、の順に洗浄した。洗浄後、磁石で顆粒を集め、上清を捨て、10%ブロックエース含有PBS（-）／BSAに約 $4 \times 10^8$ 顆粒/mL（30mg/mL）の濃度に懸濁した。得られたIgG結合顆粒は、4℃で少なくとも6カ月間は安定である。

【0045】

#### 【実施例8】磁気顆粒法による尿中メグシンタンパク質の測定

正常者12例、および各種腎疾患患者24例の随時尿試料について、メグシンタンパク質の濃度を実施例7で用意した抗体結合顆粒を利用する磁気顆粒法によって測定した。腎疾患患者24例の内訳は、IgA腎症12例、微小変化型ネフローゼ症候群12例である。尿試料は-80℃に保存し、測定時に解凍して3000rpmで5分間遠心分離した後の上清を試料として用いた。測定操作は次のとおりである。

一次抗体（ウサギポリクローナル抗メグシンペプチド2抗体を結合した磁気顆粒50万個をあらかじめブロックエース（大日本製薬製）でブロッキングしたチ

ューブ (1.5 mL) に入れた。このチューブに各尿試料 500  $\mu$ L と PBS (-) で希釈したアルカリフォスファターゼ標識ウサギポリクローナル抗メグシンペプチド 1 抗体を等量加え、回転させながら室温で 2 時間反応させた。次に、3000 rpm で 5 分遠心後、磁石で顆粒を固定しながら上清をすて、洗浄液である 0.05 % (w/v) Tween 20 (和光純薬製) 含有 PBS (-) (pH 7.4) (Tween-PBS) を 1 mL 加え攪拌し洗浄した。この洗浄操作を合計 4 回行った後、基質液 100  $\mu$ L を加えて攪拌しながら 20~30 分反応させた。基質液には、1 mg/mL オルトフェニレンジアミン (和光純薬製) の 1 M ジエタノールアミン (和光純薬製) 緩衝液 (pH 9.8) を用いた。反応終了後、1 N 水酸化ナトリウム 50  $\mu$ L を加えて反応を停止し、吸光度 (405 nm) を測定し、検量線から尿中メグシンタンパク質の濃度を算出した。同じ尿試料について実施例 5 と同様にクレアチニン濃度を求め、メグシンタンパク質の濃度をクレアチニン比として補正した。

測定の結果、尿中メグシンタンパク質の測定値 (クレアチニン補正值: AU) は、正常者に比べ IgA 腎症患者において高値に分布する。また、IgA 腎症患者と微小変化型ネフローゼ症候群では、IgA 腎症患者において高値となった。従って、本発明の方法によれば、腎障害の判定のみならず、腎疾患の病態の確定が可能となることが明らかとなった。

#### 【0046】

【実施例 9】メグシンペプチド抗体を利用した腎臓組織に対する免疫組織染色 (イムノヒストケミスト)

同意を得た 3 名の IgA 腎症患者 (男性 2 例、女性 1 例: 年齢 21~48 歳) から腎臓組織を採取した。

腎臓組織は、常法に従い、凍結組織包埋剤 (O. C. T. compound) を用いて包埋した。この凍結包埋組織からフリオスタットを用いて 4  $\mu$ m の凍結切片を作製した。この凍結切片を 3-アミノプロピルトリエトキシシラン (シグマ製) でコートしたスライド上にマウントした (4% パラホルムアルデヒド固定、15 分)。

凍結切片を 0.5% の Tween20 を含有する PBS で洗浄し、4% のスキムミルクでブロッキング後、4℃ の加湿チャンバー内で抗メグシンペプチド-2 抗体と 1 晩イン

キュベートした。組織切片を洗浄し、1:100に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体(DAKO製)を用いて室温で2時間インキュベートした。ペルオキシダーゼの検出には、0.003%の過酸化水素水を含む3,3'-ジアミノベンジジン溶液を用いた。細胞核は、ヘマトキシリンで染色した。ヘマトキシリン/エオシン染色は、公知の方法により実施した。

IgA腎症患者の腎臓組織に対して組織免疫染色した顕微鏡写真(ニコン製ECLIPSE E400:倍率80倍)を図6に示す。図から明らかなように、ヒト腎臓糸球体組織に本発明のペプチド抗体で染色される部位が存在し、特に、メサンギウム細胞胞体内およびメサンギウム基質に顕著な陽性染色が認められたが、尿細管には認められなかった。

#### 【0047】

##### 〔実施例10〕免疫沈降

ヒトメサンギウム細胞中のメグシンタンパク質の存在を確認するために、 $[^3\text{S}]$ メチオニンを用いた免疫沈降(T.Minori. et al., J.Biol.Chem., 第259巻, 560頁, 1984年)を行い、得られた免疫複合体をSDS-PAGEおよびオートラジオグラフィーにより分析し、メグシンタンパク質の検出を試みた。

まず、メサンギウム細胞を標識培地中(DMEM:10%非働化ウシ胎仔血清および $[^3\text{S}]$ メチオニン(3.7Mbq/mL)を添加したもの)、5%CO<sub>2</sub>培養器で37℃、16時間インキュベーションし、全タンパク質成分を標識した。

次に、細胞を冷PBSで洗浄し、1%Triton X-100、1%ウシヘモグロビン、1mMヨードアセトアミド、0.2U/mLアプロチニンおよび1mMのPMSF(フェニルメタンスルホニルフルオリド)を含むTSA(トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)、0.14M塩化ナトリウム、0.025%アジ化ナトリウム)200μLで懸濁した。4℃で1時間放置後、4℃、100000×gで1時間遠心し、ライセートを得た。

この放射性標識された抗原(105-106cpm)と実施例1および2で得られた抗メグシンペプチド-2ポリクローナル抗体1μL(0.7mg/mL)を4℃で90分間インキュベートした。

プロテインG-セファロース(ファルマシア・バイオテック製)を用い、さらに

4℃で90分間インキュベーションし、免疫複合体を沈澱させた。そして、0.1% Triton X-100および0.1%ウシヘモグロビンを含むTSAで3回洗浄後、0.05M トリス-塩酸緩衝液 (pH 6.8) で洗浄した。

洗浄免疫沈降物を30  $\mu$ Lのサンプルバッファー (0.05M トリス-塩酸緩衝液 (pH 6.8)、10% SDS、 $\beta$ -メルカプトエタノール、グリセロール、1% BPB) に再懸濁した後、5分間煮沸した。ボルテックスミキサーを用いて懸濁後、200  $\times$  gで1分間遠心する。上清について、常法によりSDS電気泳動およびオートラジオグラフィーにより分析した。分子量マーカーには、<sup>14</sup>C-メチル化タンパク質混合物を用いた (アマシャム・インターナショナル製: 分子量220、97.4、66、46、30 kDa)。結果を図7に示す。分子量50 kDa付近 (レーン2のmegで示したバンド) に、抗メグシンペプチド-2抗体により特異的に認識されるポリペプチドが確認できた。

【0048】

[実施例11] ELISAによるメグシンの測定

CHO細胞で発現させたメグシンタンパク質 (CHO-メグシンタンパク質: T.Miyata et al., J.Clin.Invest., 第120巻, 828-836頁, 1998年, PCT出願 PCT/JP98/04269) および実施例3に記載のMBP-メグシンタンパク質についてELISA分析を試みた。

96穴ELISA用プレートに50 mMの炭酸緩衝液 (pH 9.6) で段階希釈した精製CHO-メグシンタンパク質溶液 (50  $\mu$ L/ウェル) を加え、4℃で一晩放置した。PBSで洗浄後、ブロックエース (大日本製薬製) を加えて (350  $\mu$ L/ウェル) 室温で2時間ブロッキングした後、0.05%のTween20含有PBS (Tween-PBS) で洗浄した。次に実施例1および2で得られた抗メグシンペプチド-2ポリクローナル抗体をTween-PBSで希釈した液を50  $\mu$ L/ウェルずつ加え、室温で1時間放置した。Tween-PBSで洗浄した後、ビオチン標識抗ウサギIgG (カッペル製) を添加し、4℃で一晩放置後、Tween-PBSで洗浄した。

各ウェルにペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン溶液 (アマシャム製) を加え、室温で1時間放置した。Tween-PBSで洗浄後、100  $\mu$ L/ウェルのオ

ルトフェニレンジアミン発色基質溶液（0.009%過酸化水素水含有クエン酸-リン酸緩衝液（pH 5.0）にオルトフェニレンジアミンを0.04%の濃度になるように溶解した液）を添加した。室温、暗所で10～30分間反応させた後、2 M硫酸50  $\mu$ L/ウェルを加えて反応を停止させ、マイクロプレートリーダー（日本モレキュラーデバイス製：SPECTRAMax250）で492 nmにおける吸光度を測定した。

MBP-メグシンタンパク質についても同様に操作した。結果を図8（CHO-メグシンタンパク質）および図9（MBP-メグシンタンパク質）に示す。その結果、ペプチド-2抗体が濃度依存的にメグシンタンパク質と特異的に反応することが明らかとなった。

【0049】

【発明の効果】

本発明によれば、腎生検のような侵襲性の高い検査ではなく、尿や血液のような侵襲性材料によって腎機能の評価を可能とする。in vitroでの簡便な腎機能の評価が実現したことにより、より多くの被験者について、迅速に、しかも安価に検査サービスを提供することができる。腎疾患には、早期に発見し人工透析治療の開始を少しでも遅らせることが望まれるものも多い。したがって、本発明は単に被験者の負担を軽減するのみならず、簡便な検査手法による腎機能評価方法の提供を通じて、より多くの透析治療予備軍の発見と監視を可能とするものである。しかも尿中や血中のような生体試料中に見出されるメグシンタンパク質は、腎機能を反映する優れた指標であり、その評価においては高い信頼性を期待できる。

特に、本発明によって提供されるメグシンタンパク質の免疫学的検出方法とそのためのキットは、磁性顆粒担体の採用した操作性に優れた手法である。このような検出方法によって、より迅速で、正確なメグシンタンパク質の測定が可能となる。またメサングウム細胞の増殖程度を把握できることから、IgA腎症の治療に用いられるステロイド療法の導入時期や継続の可否の判断も容易となる。

【0050】

【配列表】



SEQUENCE LISTING

<110> MIYATA, Toshio

KUROKAWA, Kiyoshi

Fuso Pharmaceutical Industries, Ltd.

<120> A method of Detecting the Megsin Protein, and Use  
Thereof.

<130> F2-101

<140>

<141>

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1143

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1140)

<300>

<302> A mesangium-predominant gene, megsin, is a new serpin

upregulated in IgA nephropathy.

<303> J. Clin. Invest.

<304> 120

<305> 4

<306> 828-836

<307> 1998-8-15

<400> 1

atg gcc tcc ctt gct gca gca aat gca gag ttt tgc ttc aac ctg ttc 48

Met Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asn Ala Glu Phe Cys Phe Asn Leu Phe

1

5

10

15

aga gag atg gat gac aat caa gga aat gga aat gtg ttc ttt tcc tct 96

Arg Glu Met Asp Asp Asn Gln Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe Ser Ser

20

25

30

ctg agc ctc ttc gct gcc ctg gcc ctg gtc cgc ttg ggc gct caa gat 144

Leu Ser Leu Phe Ala Ala Leu Ala Leu Val Arg Leu Gly Ala Gln Asp

35

40

45

gac tcc ctc tct cag att gat aag ttg ctt cat gtt aac act gcc tca 192

Asp Ser Leu Ser Gln Ile Asp Lys Leu Leu His Val Asn Thr Ala Ser

50

55

60

gga tat gga aac tct tct aat agt cag tca ggg ctc cag tct caa ctg 240

Gly Tyr Gly Asn Ser Ser Asn Ser Gln Ser Gly Leu Gln Ser Gln Leu

65

70

75

80

aaa aga gtt ttt tct gat ata aat gca tcc cac aag gat tat gat ctc 288

Lys Arg Val Phe Ser Asp Ile Asn Ala Ser His Lys Asp Tyr Asp Leu

85

90

95

agc att gtg aat ggg ctt ttt gct gaa aaa gtg tat ggc ttt cat aag 336

Ser Ile Val Asn Gly Leu Phe Ala Glu Lys Val Tyr Gly Phe His Lys

100

105

110

gac tac att gag tgt gcc gaa aaa tta tac gat gcc aaa gtg gag cga 384

Asp Tyr Ile Glu Cys Ala Glu Lys Leu Tyr Asp Ala Lys Val Glu Arg

115

120

125

gtt gac ttt acg aat cat tta gaa gac act aga cgt aat att aat aag 432

Val Asp Phe Thr Asn His Leu Glu Asp Thr Arg Arg Asn Ile Asn Lys

130

135

140

tgg gtt gaa aat gaa aca cat ggc aaa atc aag aac gtg att ggt gaa 480

Trp Val Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Asn Val Ile Gly Glu

145

150

155

160

ggt ggc ata agc tca tct gct gta atg gtg ctg gtg aat gct gtg tac 528

Gly Gly Ile Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val Asn Ala Val Tyr

165

170

175

ttc aaa ggc aag tgg caa tca gcc ttc acc aag agc gaa acc ata aat 576

Phe Lys Gly Lys Trp Gln Ser Ala Phe Thr Lys Ser Glu Thr Ile Asn

180

185

190

tgc cat ttc aaa tct ccc aag tgc tct ggg aag gca gtc gcc atg atg 624

Cys His Phe Lys Ser Pro Lys Cys Ser Gly Lys Ala Val Ala Met Met

特平 1 1 — 3 0 6 6 2 3

195

200

205

cat cag gaa cgg aag ttc aat ttg tct gtt att gag gac cca tca atg 672

His Gln Glu Arg Lys Phe Asn Leu Ser Val Ile Glu Asp Pro Ser Met

210

215

220

aag att ctt gag ctc aga tac aat ggt ggc ata aac atg tac gtt ctg 720

Lys Ile Leu Glu Leu Arg Tyr Asn Gly Gly Ile Asn Met Tyr Val Leu

225

230

235

240

ctg cct gag aat gac ctc tct gaa att gaa aac aaa ctg acc ttt cag 768

Leu Pro Glu Asn Asp Leu Ser Glu Ile Glu Asn Lys Leu Thr Phe Gln

245

250

255

aat cta atg gaa tgg acc aat cca agg cga atg acc tct aag tat gtt 816

Asn Leu Met Glu Trp Thr Asn Pro Arg Arg Met Thr Ser Lys Tyr Val

260

265

270

gag gta ttt ttt cct cag ttc aag ata gag aag aat tat gaa atg aaa 864

Glu Val Phe Phe Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asn Tyr Glu Met Lys

275

280

285

caa tat ttg aga gcc cta ggg ctg aaa gat atc ttt gat gaa tcc aaa 912

Gln Tyr Leu Arg Ala Leu Gly Leu Lys Asp Ile Phe Asp Glu Ser Lys

290

295

300

gca gat ctc tct ggg att gct tcg ggg ggt cgt ctg tat ata tca agg 960

Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Ile Ser Arg

305

310

315

320

atg atg cac aaa tct tac ata gag gtc act gag gag ggc acc gag gct 1008

Met Met His Lys Ser Tyr Ile Glu Val Thr Glu Glu Gly Thr Glu Ala

325

330

335

act gct gcc aca gga agt aat att gta gaa aag caa ctc cct cag tcc 1056

Thr Ala Ala Thr Gly Ser Asn Ile Val Glu Lys Gln Leu Pro Gln Ser

340

345

350

acg ctg ttt aga gct gac cac cca ttc cta ttt gtt atc agg aag gat 1104

Thr Leu Phe Arg Ala Asp His Pro Phe Leu Phe Val Ile Arg Lys Asp

355

360

365

gac atc atc tta ttc agt ggc aaa gtt tct tgc cct tga

1143

Asp Ile Ile Leu Phe Ser Gly Lys Val Ser Cys Pro

370

375

380

<210> 2

<211> 380

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asn Ala Glu Phe Cys Phe Asn Leu Phe

1

5

10

15

Arg Glu Met Asp Asp Asn Gln Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe Ser Ser

20

25

30

Leu Ser Leu Phe Ala Ala Leu Ala Leu Val Arg Leu Gly Ala Gln Asp

35

40

45

Asp Ser Leu Ser Gln Ile Asp Lys Leu Leu His Val Asn Thr Ala Ser

50

55

60

Gly Tyr Gly Asn Ser Ser Asn Ser Gln Ser Gly Leu Gln Ser Gln Leu

65

70

75

80

Lys Arg Val Phe Ser Asp Ile Asn Ala Ser His Lys Asp Tyr Asp Leu

85

90

95

Ser Ile Val Asn Gly Leu Phe Ala Glu Lys Val Tyr Gly Phe His Lys

100

105

110

Asp Tyr Ile Glu Cys Ala Glu Lys Leu Tyr Asp Ala Lys Val Glu Arg

115

120

125

Val Asp Phe Thr Asn His Leu Glu Asp Thr Arg Arg Asn Ile Asn Lys

130

135

140

Trp Val Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Asn Val Ile Gly Glu

145

150

155

160

Gly Gly Ile Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val Asn Ala Val Tyr

165

170

175

Phe Lys Gly Lys Trp Gln Ser Ala Phe Thr Lys Ser Glu Thr Ile Asn

180

185

190

Cys His Phe Lys Ser Pro Lys Cys Ser Gly Lys Ala Val Ala Met Met

195

200

205

His Gln Glu Arg Lys Phe Asn Leu Ser Val Ile Glu Asp Pro Ser Met

210

215

220

Lys Ile Leu Glu Leu Arg Tyr Asn Gly Gly Ile Asn Met Tyr Val Leu

225

230

235

240

Leu Pro Glu Asn Asp Leu Ser Glu Ile Glu Asn Lys Leu Thr Phe Gln

245

250

255

Asn Leu Met Glu Trp Thr Asn Pro Arg Arg Met Thr Ser Lys Tyr Val

260

265

270

Glu Val Phe Phe Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asn Tyr Glu Met Lys

275

280

285

Gln Tyr Leu Arg Ala Leu Gly Leu Lys Asp Ile Phe Asp Glu Ser Lys

290

295

300

Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Ile Ser Arg

305

310

315

320

Met Met His Lys Ser Tyr Ile Glu Val Thr Glu Glu Gly Thr Glu Ala

325

330

335

特平 1 1 - 3 0 6 6 2 3

Thr Ala Ala Thr Gly Ser Asn Ile Val Glu Lys Gln Leu Pro Gln Ser

340

345

350

Thr Leu Phe Arg Ala Asp His Pro Phe Leu Phe Val Ile Arg Lys Asp

355

360

365

Asp Ile Ile Leu Phe Ser Gly Lys Val Ser Cys Pro

370

375

380

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized degenerative primer sequence

<400> 3

gtgaatgctg tgtacttaaa ggcaantgn

29

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized degenerative primer sequence

<400> 4

aanagraang grtcngc

17

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized degenerative primer sequence

<400> 5

tatggcntcn gcngcngcng cnaaygc

27

<210> 6

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized degenerative primer sequence

<400> 6

cgacctccag aggcaattcc agagagatca gccctgg

37

<210> 7

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

---

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized degenerative primer sequence

<400> 7

gtcttccaag cctacagatt tcaagtggct cctc

34

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized antisense primer sequence

<400> 8

gctcagggca gtgaagatgc tcaggaaga

30

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized antisense primer sequence

<400> 9

ctgacgtgca cagtcacctc gagcacc

27

<210> 10

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized sense primer sequence

<400> 10

gaggtctcag aagaaggcac tgaggcaact gctgcc

36

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized domain peptide of human megsin

<400> 11

Cys Phe Arg Glu Met Asp Asp Asn Gln Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe

1

5

10

15

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized domain peptide of human megsin

<400> 12

Cys Ser Gln Ser Gly Leu Gln Ser Gln Leu Lys Arg Val Phe Ser Asp

1

5

10

15

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized domain peptide of human megsin

<400> 13

Ala Thr Gly Ser Asn Ile Val Glu Lys Gln Leu Pro Gln Ser Thr Leu

1 5 10 15

Cys

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
synthesized domain peptide of human megsin

<400> 14

Cys Ser Asn Ile Val Glu Lys Gln Leu Pro Gln Ser Thr Leu Phe Arg

1 5 10 15

<210> 15

<211> 1229

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (8)..(1147)

<300>

<310> PCT/JP98/04269

<311> 1998-09-22

<400> 15

tttcaaa atg gcc tcc ctt gct gca gca aat gca gaa ttt ggc ttc gac. 49

Met Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asn Ala Glu Phe Gly Phe Asp

1

5

10

tta ttc aga gag atg gat agt agt caa gga aac gga aat gta ttc ttc 97

Leu Phe Arg Glu Met Asp Ser Ser Gln Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe

15

20

25

30

tct tcc ctg agc atc ttc act gcc ctg agc cta atc cgt ttg ggt gct 145

Ser Ser Leu Ser Ile Phe Thr Ala Leu Ser Leu Ile Arg Leu Gly Ala

35

40

45

cga ggt gac tgt nnn cgt cag att gac aag gcc ctg cac ttt atc tcc 193

Arg Gly Asp Cys Xaa Arg Gln Ile Asp Lys Ala Leu His Phe Ile Ser

50

55

60

cca tca aga caa ggg aat tca tca aac agt cag cta gga ctg caa tat 241

Pro Ser Arg Gln Gly Asn Ser Ser Asn Ser Gln Leu Gly Leu Gln Tyr

65

70

75

caa ttg aaa aga gtt ctt gct gac ata aac tca tct cat aag gat nnn 289

Gln Leu Lys Arg Val Leu Ala Asp Ile Asn Ser Ser His Lys Asp Xaa

80

85

90

aaa ctc agc att gcc aat gga gtt ttt gca gag aaa gta ttt gat ttt 337

Lys Leu Ser Ile Ala Asn Gly Val Phe Ala Glu Lys Val Phe Asp Phe

95

100

105

110

cat aag agc tat atg gag tgt gct gaa aac tta tac aat gct aaa gtg 385

His Lys Ser Tyr Met Glu Cys Ala Glu Asn Leu Tyr Asn Ala Lys Val

115

120

125

gaa aga gtt gat ttt aca aat gat ata caa gaa acc aga ttt aaa att 433

Glu Arg Val Asp Phe Thr Asn Asp Ile Gln Glu Thr Arg Phe Lys Ile

130

135

140

aat aaa tgg att gaa aat gaa aca cat ggc aaa atc aag aag gtg ttg 481

Asn Lys Trp Ile Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Lys Val Leu

145

150

155

ggg gac agc agc ctc agc tca tca gct gtc atg gtg cta gtg aat gct 529

Gly Asp Ser Ser Leu Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val Asn Ala

160

165

170

gtt tac ttc aaa ggc aag tgg aaa tca gcc ttc acc aag agt gat acc 577

特平 1 1 - 3 0 6 6 2 3

Val Tyr Phe Lys Gly Lys Trp Lys Ser Ala Phe Thr Lys Ser Asp Thr  
175 180 185 190

ctc agt tgc cat ttc agg tct ccc agc ggt cct gga aaa gca gtt aat 625  
Leu Ser Cys His Phe Arg Ser Pro Ser Gly Pro Gly Lys Ala Val Asn  
195 200 205

atg atg cat caa gaa cgg agg ttc aat ttg tct acc att cag gag cca 673  
Met Met His Gln Glu Arg Arg Phe Asn Leu Ser Thr Ile Gln Glu Pro  
210 215 220

cca atg cag att ctt gag cta caa tat cat ggt ggc ata agc atg tac 721  
Pro Met Gln Ile Leu Glu Leu Gln Tyr His Gly Gly Ile Ser Met Tyr  
225 230 235

atc atg ttg ccc gag gat gac cta tcc gaa att gaa agc aag ctg agt 769  
Ile Met Leu Pro Glu Asp Asp Leu Ser Glu Ile Glu Ser Lys Leu Ser  
240 245 250

ttc cag aat cta atg gac tgg aca aat agc agg aag atg aaa tct cag 817  
Phe Gln Asn Leu Met Asp Trp Thr Asn Ser Arg Lys Met Lys Ser Gln  
255 260 265 270

tat gtg aat gtg ttt ctc ccc cag ttc aag ata gag aaa gat tat gaa 865  
Tyr Val Asn Val Phe Leu Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asp Tyr Glu  
275 280 285

atg agg agc cac ttg aaa tct gta ggc ttg gaa gac atc ttt gtt gag 913  
Met Arg Ser His Leu Lys Ser Val Gly Leu Glu Asp Ile Phe Val Glu



290

295

300

tcc agg gct gat ctg tct gga att gcc tct gga ggt cgt ctc tat gta 961

Ser Arg Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Val

305

310

315

tca aag cta atg cac aag tcc ctc ata gag gtc tca gaa gaa ggc acc 1009

Ser Lys Leu Met His Lys Ser Leu Ile Glu Val Ser Glu Glu Gly Thr

320

325

330

gag gca act gct gcc aca gaa agt aac atc gtt gaa aag cta ctt cct 1057

Glu Ala Thr Ala Ala Thr Glu Ser Asn Ile Val Glu Lys Leu Leu Pro

335

340

345

350

gaa tcc acg gtg ttc aga gct gac cgc ccc ttt ctg ttt gtc att agg 1105

Glu Ser Thr Val Phe Arg Ala Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val Ile Arg

355

360

365

aag aat ggc atc atc tta ttt act ggc aaa gtc tcg tgt cct 1147

Lys Asn Gly Ile Ile Leu Phe Thr Gly Lys Val Ser Cys Pro

370

375

380

tgaaattcta tttggttttc catacactaa caggcatgaa gaaacatcat aagtgaatag 1207

aattgtaatt ggaagtacat gg

1229

<210> 16

<211> 380

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 16

Met Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asn Ala Glu Phe Gly Phe Asp Leu Phe

1 5 10 15

Arg Glu Met Asp Ser Ser Gln Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe Ser Ser

20 25 30

Leu Ser Ile Phe Thr Ala Leu Ser Leu Ile Arg Leu Gly Ala Arg Gly

35 40 45

Asp Cys Xaa Arg Gln Ile Asp Lys Ala Leu His Phe Ile Ser Pro Ser

50 55 60

Arg Gln Gly Asn Ser Ser Asn Ser Gln Leu Gly Leu Gln Tyr Gln Leu

65 70 75 80

Lys Arg Val Leu Ala Asp Ile Asn Ser Ser His Lys Asp Xaa Lys Leu

85 90 95

Ser Ile Ala Asn Gly Val Phe Ala Glu Lys Val Phe Asp Phe His Lys

100 105 110

Ser Tyr Met Glu Cys Ala Glu Asn Leu Tyr Asn Ala Lys Val Glu Arg

115 120 125

Val Asp Phe Thr Asn Asp Ile Gln Glu Thr Arg Phe Lys Ile Asn Lys

130	135	140
Trp Ile Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Lys Val Leu Gly Asp		
145	150	155 160
Ser Ser Leu Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val Asn Ala Val Tyr		
165	170	175
Phe Lys Gly Lys Trp Lys Ser Ala Phe Thr Lys Ser Asp Thr Leu Ser		
180	185	190
Cys His Phe Arg Ser Pro Ser Gly Pro Gly Lys Ala Val Asn Met Met		
195	200	205
His Gln Glu Arg Arg Phe Asn Leu Ser Thr Ile Gln Glu Pro Pro Met		
210	215	220
Gln Ile Leu Glu Leu Gln Tyr His Gly Gly Ile Ser Met Tyr Ile Met		
225	230	235 240
Leu Pro Glu Asp Asp Leu Ser Glu Ile Glu Ser Lys Leu Ser Phe Gln		
245	250	255
Asn Leu Met Asp Trp Thr Asn Ser Arg Lys Met Lys Ser Gln Tyr Val		
260	265	270
Asn Val Phe Leu Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asp Tyr Glu Met Arg		
275	280	285

Ser His Leu Lys Ser Val Gly Leu Glu Asp Ile Phe Val Glu Ser Arg

290

295

300

Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Val Ser Lys

305

310

315

320

Leu Met His Lys Ser Leu Ile Glu Val Ser Glu Glu Gly Thr Glu Ala

325

330

335

Thr Ala Ala Thr Glu Ser Asn Ile Val Glu Lys Leu Leu Pro Glu Ser

340

345

350

Thr Val Phe Arg Ala Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val Ile Arg Lys Asn

355

360

365

Gly Ile Ile Leu Phe Thr Gly Lys Val Ser Cys Pro

370

375

380

<210> 17

<211> 1147

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1104)

<300>

<310> PCT/JP98/04269

<311> 1998-09-22

<400> 17

ttc gac tta ttc aga gag atg gat agt agc caa gga aat gga aat gta 48

Phe Asp Leu Phe Arg Glu Met Asp Ser Ser Gln Gly Asn Gly Asn Val

1

5

10

15

ttc ttc tct tcc ctg agc atc ttc act gcc ctg acc cta atc cgt ctg 96

Phe Phe Ser Ser Leu Ser Ile Phe Thr Ala Leu Thr Leu Ile Arg Leu

20

25

30

ggt gct cga ggt gac tgt gca cgt cag att gac aag gca ctg cac ttt 144

Gly Ala Arg Gly Asp Cys Ala Arg Gln Ile Asp Lys Ala Leu His Phe

35

40

45

aac ata cca tca aga caa gga aac tca tct aat aat cag cca gga ctt 192

Asn Ile Pro Ser Arg Gln Gly Asn Ser Ser Asn Asn Gln Pro Gly Leu

50

55

60

cag tat caa ttg aaa aga gtt ctt gct gac ata aac tca tct cat aag 240

Gln Tyr Gln Leu Lys Arg Val Leu Ala Asp Ile Asn Ser Ser His Lys

65

70

75

80

gat tat gaa ctc agc att gcc act gga gtt ttt gca gaa aaa gtc tat 288

Asp Tyr Glu Leu Ser Ile Ala Thr Gly Val Phe Ala Glu Lys Val Tyr

85

90

95

gac ttt cat aag aac tac att gag tgt gct gaa aac tta tac aat gct 336

Asp Phe His Lys Asn Tyr Ile Glu Cys Ala Glu Asn Leu Tyr Asn Ala

100

105

110

aaa gtg gaa aga gtt gac ttc aca aat gat gta caa gat acc aga ttt 384

Lys Val Glu Arg Val Asp Phe Thr Asn Asp Val Gln Asp Thr Arg Phe

115

120

125

aaa att aat aaa tgg att gaa aat gag aca cat gga aag atc aag aag 432

Lys Ile Asn Lys Trp Ile Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Lys

130

135

140

gtg ttg ggc gac agc agc ctc agc tcg tcg gct gtc atg gtg ctg gtg 480

Val Leu Gly Asp Ser Ser Leu Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val

145

150

155

160

aac gct gtt tac ttc aaa ggc aaa tgg aaa tcg gcc ttc acc aag act 528

Asn Ala Val Tyr Phe Lys Gly Lys Trp Lys Ser Ala Phe Thr Lys Thr

165

170

175

gat acc ctc agt tgc cgt ttt agg tct ccc acg tgt cct gga aaa gta 576

Asp Thr Leu Ser Cys Arg Phe Arg Ser Pro Thr Cys Pro Gly Lys Val

180

185

190

gtt aat atg atg cat caa gaa cgg cgg ttc aat ttg tct acc att cag 624

Val Asn Met Met His Gln Glu Arg Arg Phe Asn Leu Ser Thr Ile Gln

195

200

205

cag cca cca atg cag gtt ctt gag ctc caa tat cat ggt ggc ata agc 672

Gln Pro Pro Met Gln Val Leu Glu Leu Gln Tyr His Gly Gly Ile Ser

210	215	220	
atg tac att atg ctg cct gag gat ggc cta tgt gaa att gaa agc aag 720			
Met Tyr Ile Met Leu Pro Glu Asp Gly Leu Cys Glu Ile Glu Ser Lys			
225	230	235	240
ctg agt ttc cag aat ctg atg gac tgg acc aat agg agg aaa atg aaa 768			
Leu Ser Phe Gln Asn Leu Met Asp Trp Thr Asn Arg Arg Lys Met Lys			
	245	250	255
tct cag tat gtg aac gtg ttt ctc ccc cag ttc aag ata gag aag aat 816			
Ser Gln Tyr Val Asn Val Phe Leu Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asn			
	260	265	270
tat gaa atg acg cac cac ttg aaa tcc tta ggc ttg aaa gat atc ttt 864			
Tyr Glu Met Thr His His Leu Lys Ser Leu Gly Leu Lys Asp Ile Phe			
	275	280	285
gat gag tcc agt gca gat ctc tct gga att gcc tct gga ggt cgt ctc 912			
Asp Glu Ser Ser Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu			
290	295	300	
tac gta tca aag cta atg cac aag tca ttc ata gag gtc tca gag gag 960			
Tyr Val Ser Lys Leu Met His Lys Ser Phe Ile Glu Val Ser Glu Glu			
305	310	315	320
ggc act gaa gcc act gct gcc aca gaa aat aac att gtt gaa aag cag 1008			
Gly Thr Glu Ala Thr Ala Ala Thr Glu Asn Asn Ile Val Glu Lys Gln			
	325	330	335

ctt cct gag tcc aca gtg ttc aga gcc gac cgc ccc ttt ctg ttt gtc 1056  
 Leu Pro Glu Ser Thr Val Phe Arg Ala Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val  
 340 345 350

atc aag aag aat gac atc atc tta ttt act ggc aaa gtc tct tgt cct 1104  
 Ile Lys Lys Asn Asp Ile Ile Leu Phe Thr Gly Lys Val Ser Cys Pro  
 355 360 365

tgaaattcga ttigtgttcc tatacagtaa caggcatcaa gaa 1147

<210> 18

<211> 368

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Phe Asp Leu Phe Arg Glu Met Asp Ser Ser Gln Gly Asn Gly Asn Val

1 5 10 15

Phe Phe Ser Ser Leu Ser Ile Phe Thr Ala Leu Thr Leu Ile Arg Leu

20 25 30

Gly Ala Arg Gly Asp Cys Ala Arg Gln Ile Asp Lys Ala Leu His Phe

35 40 45

Asn Ile Pro Ser Arg Gln Gly Asn Ser Ser Asn Asn Gln Pro Gly Leu

50 55 60



Gln Tyr Gln Leu Lys Arg Val Leu Ala Asp Ile Asn Ser Ser His Lys  
65 70 75 80

Asp Tyr Glu Leu Ser Ile Ala Thr Gly Val Phe Ala Glu Lys Val Tyr  
85 90 95

Asp Phe His Lys Asn Tyr Ile Glu Cys Ala Glu Asn Leu Tyr Asn Ala  
100 105 110

Lys Val Glu Arg Val Asp Phe Thr Asn Asp Val Gln Asp Thr Arg Phe  
115 120 125

Lys Ile Asn Lys Trp Ile Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Lys  
130 135 140

Val Leu Gly Asp Ser Ser Leu Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val  
145 150 155 160

Asn Ala Val Tyr Phe Lys Gly Lys Trp Lys Ser Ala Phe Thr Lys Thr  
165 170 175

Asp Thr Leu Ser Cys Arg Phe Arg Ser Pro Thr Cys Pro Gly Lys Val  
180 185 190

Val Asn Met Met His Gln Glu Arg Arg Phe Asn Leu Ser Thr Ile Gln  
195 200 205

Gln Pro Pro Met Gln Val Leu Glu Leu Gln Tyr His Gly Gly Ile Ser

210

215

220

Met Tyr Ile Met Leu Pro Glu Asp Gly Leu Cys Glu Ile Glu Ser Lys

225

230

235

240

Leu Ser Phe Gln Asn Leu Met Asp Trp Thr Asn Arg Arg Lys Met Lys

245

250

255

Ser Gln Tyr Val Asn Val Phe Leu Pro Gln Phe Lys Ile Glu Lys Asn

260

265

270

Tyr Glu Met Thr His His Leu Lys Ser Leu Gly Leu Lys Asp Ile Phe

275

280

285

Asp Glu Ser Ser Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu

290

295

300

Tyr Val Ser Lys Leu Met His Lys Ser Phe Ile Glu Val Ser Glu Glu

305

310

315

320

Gly Thr Glu Ala Thr Ala Ala Thr Glu Asn Asn Ile Val Glu Lys Gln

325

330

335

Leu Pro Glu Ser Thr Val Phe Arg Ala Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val

340

345

350

Ile Lys Lys Asn Asp Ile Ile Leu Phe Thr Gly Lys Val Ser Cys Pro

355

360

365

【図面の簡単な説明】

【図1】メグシタンパク質の部分アミノ酸配列（配列番号：12）を有する合成ペプチド2を免疫原として得られたポリクローナル抗体の反応性をウエスタンブロット法によって確認した結果を示す写真。各レーンは、次のタンパク質に対応する。

- 1：MBP
- 2：MBP-メグシタンパク質
- 3：His-メグシタンパク質
- 4：MBP-PAI II
- 5：CHO細胞で発現させたメグシタンパク質
- 6：メグシタンパク質遺伝子導入組み換えウイルス感染カイコ体液
- 7：メグシタンパク質遺伝子導入前のウイルスベクター感染カイコ体液
- 8：非ウイルス感染カイコ体液
- 9：正常ヒト血清

【図2】メグシタンパク質の部分アミノ酸配列（配列番号：13）を有する合成ペプチド3を免疫原として得られたポリクローナル抗体の反応性をウエスタンブロット法によって確認した結果を示す写真。各レーンは、図1と同じタンパク質に対応する。

【図3】メグシタンパク質の部分アミノ酸配列（配列番号：14）を有する合成ペプチド342を免疫原として得られたポリクローナル抗体の反応性をウエスタンブロット法によって確認した結果を示す写真。各レーンは、図1と同じタンパク質に対応する。

【図4】ELISAによる尿中メグシタンパク質の測定結果を示すグラフ。縦軸はメグシタンパク質の測定値（クレアチニン比：AU）を示す。試料とした尿は、正常者（16例）、IgA腎症患者（24例）、および微小変化型ネフローゼ症候群患者（24例）のものである。

【図5】ウエスタンブロット法による尿中メグシタンパク質の測定結果を示す

写真。各レーンは、次のタンパク質に対応する。

1 : MBP-メグシンタンパク質

2-5 : 正常者濃縮尿

6-7 : IgA腎症患者濃縮尿

【図6】 IgA腎症患者の腎臓組織に対して組織免疫染色した顕微鏡写真を示す。

【図7】 免疫沈降によるメグシンタンパク質の検出結果を示す写真。

レーン1 : 抗メグシンペプチド2抗体 (-)

レーン2 : 抗メグシンペプチド2抗体 (+)

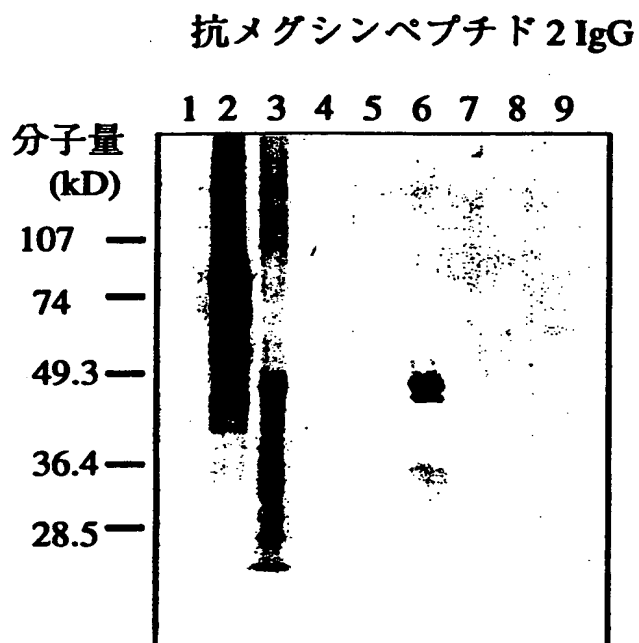
レーン3 : 分子量マーカー

【図8】 CHO-メグシンの抗メグシンペプチド2抗体を使ったELISAによる測定結果を示すグラフ。縦軸は492nmにおける吸光度を、横軸はCHO-メグシン濃度( $\mu\text{g/mL}$ )を示す。

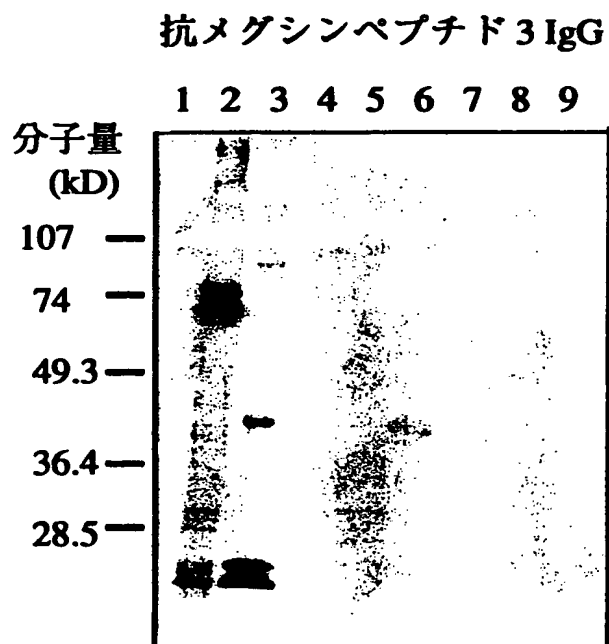
【図9】 MBP-メグシンの抗メグシンペプチド2抗体を使ったELISAによる測定結果を示すグラフ。縦軸は492nmにおける吸光度を、横軸はMBP-メグシン濃度( $\mu\text{g/mL}$ )を示す。

【書類名】 図面

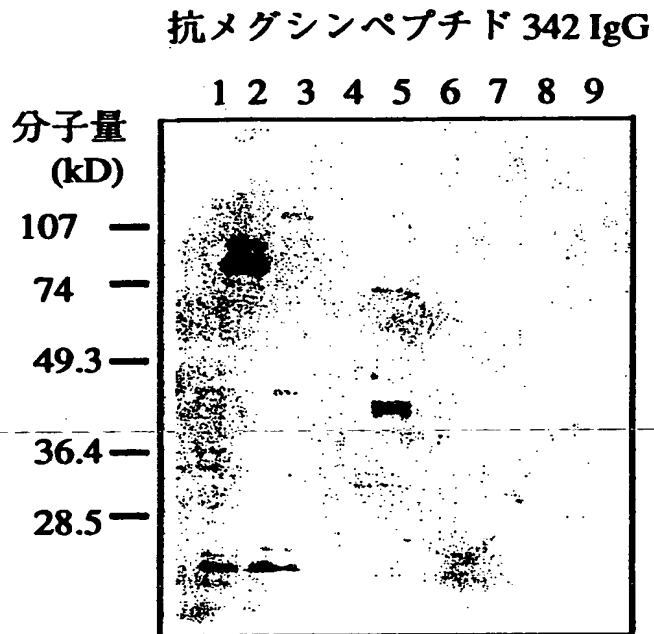
【図 1】



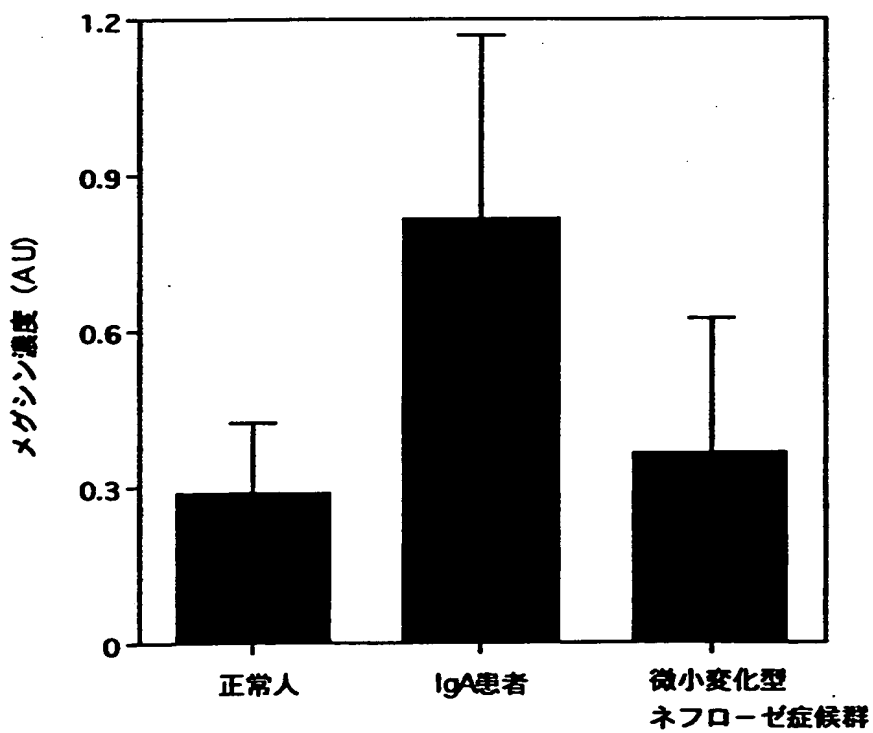
【図 2】



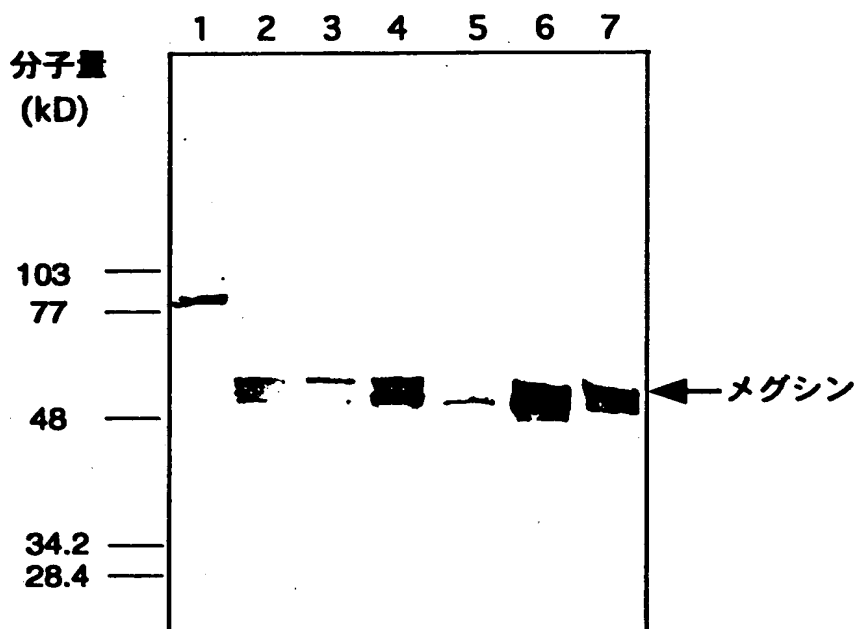
【図 3】



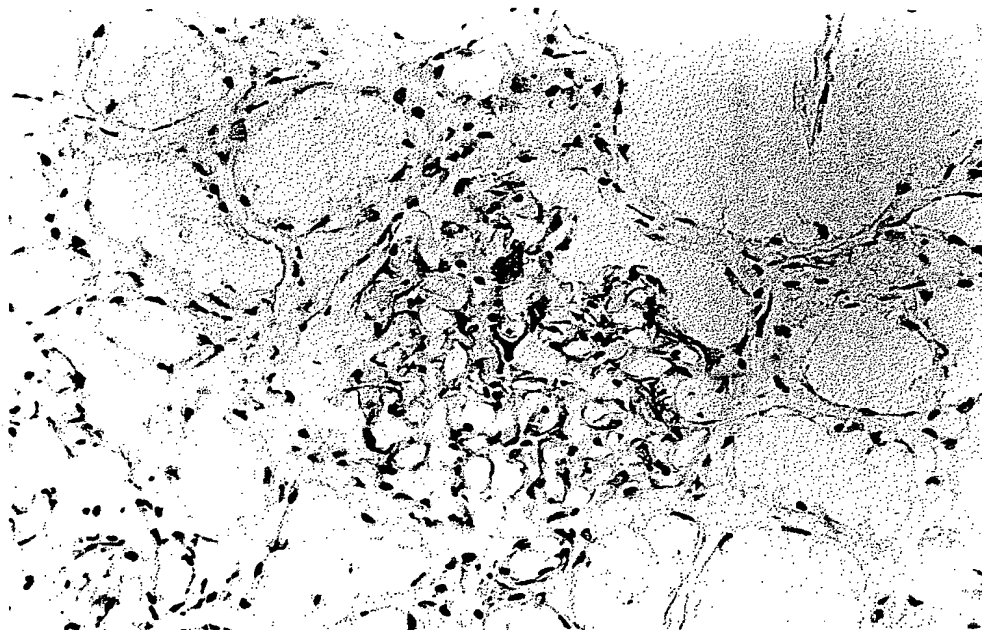
【図 4】



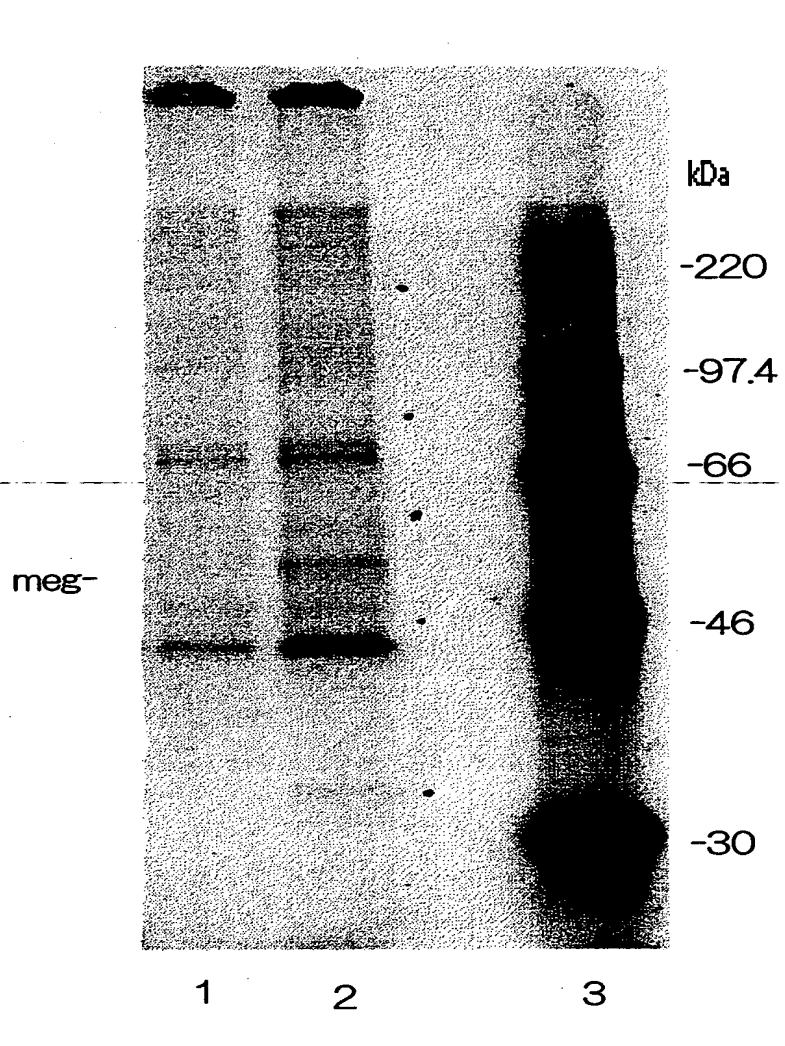
【図 5】



【図 6】

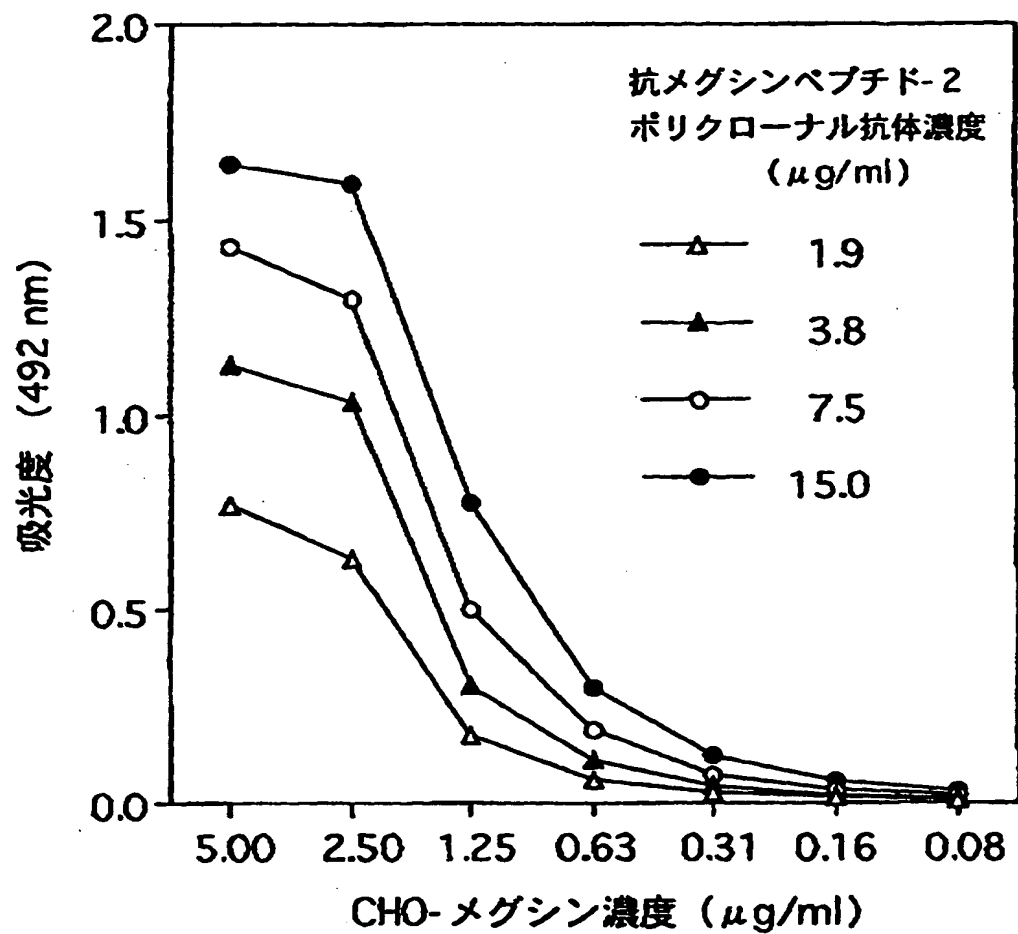


【図 7】

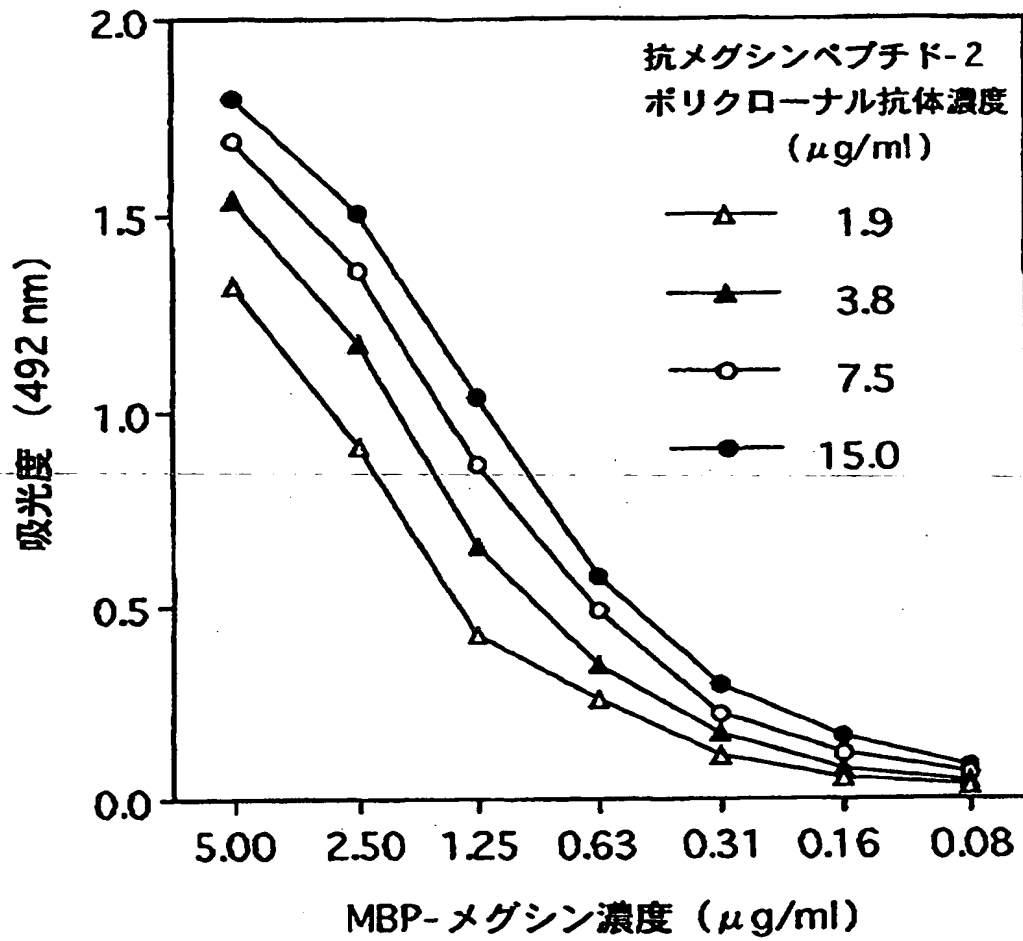




【図 8】



【図9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 in vitroにおいて実施可能な、腎疾患の診断や重症度の判定を可能とする方法と、そのための試薬の提供。

【解決手段】 本発明は、生体試料中のメグシンタンパク質の測定により、腎機能を評価する方法を提供する。また本発明は、生体試料中のメグシンタンパク質の測定に有用な免疫学的測定用試薬、ならびにキットを提供する。

【選択図】 なし

特平 11-306623

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [597142387]

1. 変更年月日	1997年 9月22日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都新宿区市谷柳町49市ヶ谷ヒルズ401
氏 名	黒川 清

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [597142376]

1. 変更年月日	1999年 2月10日
[変更理由]	住所変更
住 所	神奈川県伊勢原市東成瀬4-2-3-101
氏 名	宮田 敏男

特平 1 1 - 3 0 6 6 2 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 2 3 8 2 0 1]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 8 日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市中央区道修町 1 丁目 7 番 1 0 号
氏 名	扶桑薬品工業株式会社